



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARCOS DE ABREU ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANTÍGENOS NAS
DIFERENTES FASES DO CICLO BIOLÓGICO DO FUNGO
*Histoplasma capsulatum***

Rio de Janeiro

2019

MARCOS DE ABREU ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANTÍGENOS NAS
DIFERENTES FASES DO CICLO BIOLÓGICO DO FUNGO
*Histoplasma capsulatum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dr^a Rosely Maria Zancopé Oliveira
Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Rio de Janeiro

2019

Almeida, Marcos de Abreu.

Caracterização de proteínas e antígenos nas diferentes fases do ciclo biológico do fungo *Histoplasma capsulatum* / Marcos de Abreu Almeida. - Rio de Janeiro, 2019.

186 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2019.

Orientadora: Rosely Maria Zancopé Oliveira.

Co-orientadora: Rodrigo de Almeida Paes.

Bibliografia: f. 111-123

1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Dimorfismo. 3. Proteoma. 4. Antígenos. I. Título.

MARCOS DE ABREU ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANTÍGENOS NAS
DIFERENTES FASES DO CICLO BIOLÓGICO DO FUNGO**
Histoplasma capsulatum

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dr^a Rosely Maria Zancopé Oliveira
Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Aprovado em: 15.02.2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Cláudia Vera Pizzini (Presidenta)

Prof. Dr. Allan Jefferson Guimarães

Prof. Dr. Richard Hemmi Valente

Prof.^a Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Andréa Reis Bernardes de Souza Engemann

Carlos Roberto Alves (Revisor e Suplente)

Aos meus pais, Maria e Manoel,
pelo apoio incondicional e amor sem medida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela agradável companhia ao longo de toda essa jornada. Obrigado pela oportunidade desta experiência e por todos os dons a mim confiados.

À minha família: meus pais, Maria do Socorro e Manoel, por serem meus grandes exemplos, pela educação e valores transmitidos; à minha irmã e meu sobrinho, Mayana e Rafael. Vocês são minha inspiração e merecedores dessa conquista.

À Dra Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela orientação a mim dedicada, por todos esses anos de convívio, desde a iniciação científica... por toda paciência, ensinamentos e incentivo. Obrigado pela confiança em meu trabalho.

Ao Dr Rodrigo de Almeida Paes, pela orientação. Obrigado pela troca de experiências e ensinamentos. Obrigado também pela paciência, confiança em meu trabalho e agradável convívio diário.

Ao Dr Allan Jefferson Guimarães, por disponibilizar seu tempo acompanhando o desenvolvimento deste trabalho ao longo dos seminários científicos. Obrigado por suas críticas e valiosas sugestões. Obrigado pela parceria de sempre, e ainda, por ter aceito fazer parte da Banca Examinadora.

Ao Dr Richard Hemmi Valente, pelas críticas e valiosas sugestões a esse trabalho desde o exame de qualificação. Obrigado também por ter aceito fazer parte da Banca Examinadora.

À Dra Célia Maria de Almeida Soares, pela disponibilidade e valiosa colaboração do decorrer de todo esse trabalho. Obrigado pela afetuosa acolhida em todas as minhas visitas ao LBM (UFG), onde parte deste trabalho foi realizado, e por ter aceito fazer parte da Banca Examinadora.

À Dra Cláudia Vera Pizzini, pelos primeiros ensinamentos, desde a iniciação científica, pela amizade e incentivo. Obrigado ainda por ter aceito fazer parte da Banca Examinadora.

À Dra Andréa Reis Bernardes de Souza Engemann, pela amizade e incentivo, e por ter aceito fazer parte da Banca Examinadora.

Ao Dr Carlos Roberto Alves, pela atenciosa revisão deste trabalho e por ter aceito fazer parte da Banca Examinadora.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular (UFG), pelo acolhimento e colaboração. Um agradecimento especial ao Dr Alexandre Bailão e ao Dr Clayton Borges por todo o suporte e atenção dedicada a este trabalho.

À Dra Lilian Baeza, pela colaboração no decorrer de todo esse trabalho. No início éramos apenas colaboradores e hoje, grandes amigos. Obrigado por toda atenção e incentivo, além da paciência em ensinar (mesmo que na maioria das vezes, bem de longe).

A toda equipe do Laboratório de Toxinologia (IOC-Fiocruz), então liderado pelo Dr Jonas Perales e hoje pela Dra Ana Gisele Neves Ferreira, pelo acolhimento e colaboração. Um agradecimento especial a Joelma Saldanha, Priscila Brandão, Dra Surza Rocha e Dr André Ferreira.

Ao Dr José Mauro Peralta por permitir a utilização do Laboratório de Diagnóstico Imunológico e Molecular das Doenças Infecciosas e Parasitárias (UFRJ), para realização de parte deste trabalho.

Ao Dr Mauro de Medeiros Muniz, pelos ensinamentos ao longo de todos esses anos de convívio e pelo incentivo de sempre.

À Rosângela Alves, pelo suporte indispensável com as atividades de rotina do laboratório. Você chegou na hora certa! Obrigado pela parceria.

Aos grandes companheiros do Laboratório de Micologia, Setor Imunodiagnóstico: Fernando, obrigado por todas as discussões científicas (seja lá qual for o tema...); Vanessa, obrigado pelas inúmeras tentativas até conseguirmos montar os mapas de calor; Carlos, obrigado por todo auxílio com as culturas e as muitas eletroforeses; Luã, Lucas, Anna, Larissa e Beatriz pelas agradáveis horas de convívio. Obrigado pelo apoio, companheirismo e incentivo de sempre.

Aos companheiros do Laboratório de Micologia: Dr Bodo e Dra Márcia, obrigado pelo incentivo de sempre e confiança que depositam em meu trabalho; Helena, Fábio, Rowena, Ingrid, Iara, Luciana, Rosani, Mônica e Carla, obrigado pelos agradáveis momentos de convívio e pelo incentivo.

À Dra Priscila Marques, pelo companheirismo ao longo de todo esse processo de doutoramento. Obrigado pela amizade e incentivo contínuo.

Às amigas que hoje não fazem parte mais de nossa equipe de trabalho diária, mas que são grandes incentivadores e servem de inspiração, as doutoras Lisandra Serra e Priscila Albuquerque.

Ao Gustavo Montes, companheiro de todas horas e grande incentivador desse trabalho. Seu apoio foi fundamental para a concretização de mais essa etapa.

Aos meus amigos-irmãos, que sonharam esse doutorado comigo. Obrigado pelo incentivo de TODOS os dias, e por compreenderem muitas vezes minha ausência física... Aline, André, Danda, Denise, Cris, Maiza, Mi, MV, Rachel, Rodrigo e Rose.

A todos os amigos que sempre me deram forças com palavras de preocupação, carinho e incentivo. E para não ser injusto, não citarei nomes, até porque a lista é bem grande. O apoio e incentivo de vocês foram fundamentais, e me perdoem pelas muitas ausências nesse período.

Aos amigos que ganhei no projeto Sonhando Juntos e as crianças atendidas por nós. Por muitas vezes vocês foram minha válvula de escape nesse período um tanto que estressante. Obrigado pelo incentivo dos amigos e pelo sorriso dos pequenos heróis.

Ao corpo docente do Curso de Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, pelo estímulo e pelos ensinamentos. E a todos os funcionários deste Curso, em especial a Priscila Sá, pela atenção e eficiência de sempre.

Ao CNPq, à FAPERJ e à FAPEG, pelo suporte financeiro deste projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho, meu muito obrigado.

ALMEIDA, Marcos de Abreu. **Caracterização de proteínas e antígenos nas diferentes fases do ciclo biológico do fungo *Histoplasma capsulatum***. 2019. 186 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

RESUMO

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* é o agente etiológico da histoplasmose clássica, uma importante micose sistêmica, com distribuição cosmopolita e predomínio nas Américas. *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico, podendo se apresentar nas fases de micélio ou levedura. O dimorfismo é uma característica importante para sobrevivência fúngica em diferentes ambientes e tem sido relacionado com a virulência de *H. capsulatum*. Consequentemente, sua patogenicidade é frequentemente associada à transição dimórfica. Perfis proteômicos têm trazido importantes contribuições ao conhecimento do metabolismo e patogenicidade em vários modelos biológicos. No entanto, estudos do proteoma de *H. capsulatum* e a caracterização de prováveis proteínas antigênicas participantes tanto da resposta celular como humoral do hospedeiro têm sido ainda pouco explorados. No presente estudo, foi utilizada a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para avaliar o perfil proteômico das fases de levedura e micélio de *H. capsulatum* (G217B - ATCC 26032). Foram identificadas 696 proteínas em levedura e 623 em micélio, respectivamente. Comparadas as duas fases do fungo, 440 proteínas foram mais abundantes em levedura e 388 em micélio. Em levedura, enzimas relacionadas ao ciclo do ácido tricarboxílico e resposta ao estresse por temperatura tiveram maior abundância. Entre as proteínas que foram mais abundantes em micélio estão algumas relacionadas à via glicolítica e à fermentação alcoólica. Para identificação de potenciais alvos antigênicos na forma parasitária de *H. capsulatum* foram utilizados os métodos de coimunoprecipitação e posterior cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para identificação dessas proteínas. Desta forma, foram identificadas três proteínas (antígeno M, catalase P e YPS-3) que reagiram apenas contra soros de pacientes com histoplasmose, sendo potenciais alvos antigênicos. Estes dados indicam a possibilidade da utilização destas proteínas em novos métodos para o diagnóstico da histoplasmose. Ainda, as análises de categoria funcional das proteínas identificadas no proteoma, forneceram uma melhor compreensão da reorganização metabólica que ocorre na transição morfológica de levedura para micélio.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*. Dimorfismo. Proteoma. Antígenos.

ALMEIDA, Marcos de Abreu. **Characterization of proteins and antigens at different phases of the biological cycle of the fungus *Histoplasma capsulatum***. 2019. 186 f. Thesis (Doctoral in Clinic Research in Infection Diseases) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* is the etiologic agent of the classical histoplasmosis, an important systemic mycosis, with worldwide distribution and predominance in the Americas. *H. capsulatum* is a dimorphic fungus, and may be present as mycelium or yeast forms. Dimorphism is an important feature for fungal survival in different environments and it has been related of *H. capsulatum* virulence. Consequently, the *H. capsulatum* pathogenicity is often associated with dimorphic transition. Proteomic profiles have brought important contributions to the knowledge of metabolism and pathogenicity in several biological models. However, studies of the *H. capsulatum* proteome and the characterization of putative antigenic proteins participating in both cellular and humoral responses of the host have been underexplored. In the present study, liquid chromatography coupled to mass spectrometry was used to evaluate the proteomic profile of the yeast and mycelial phases of *H. capsulatum* (G217B - ATCC 26032). A total of 696 and 623 proteins were identified in yeast and mycelium, respectively. Comparing the two phases of the fungus, 440 proteins were more abundant in yeast and 388 in mycelium. In yeast, enzymes related to the tricarboxylic acid cycle and response to temperature stress had high abundance. Among the proteins that were most abundant in mycelium are some related to the glycolytic pathway and to the alcoholic fermentation. For the identification of potential antigenic targets in the parasitic form of *H. capsulatum*, co-immunoprecipitation method and subsequent liquid chromatography coupled to mass spectrometry were used to identify these proteins. Thus, three proteins (M antigen, catalase P, and YPS-3) were identified reacting only against sera from patients with histoplasmosis and, therefore, may be potential antigenic targets. These data indicate the possibility of the use of these proteins in new methods for the diagnosis of histoplasmosis. Furthermore, functional class analyzes of proteins identified in the proteome provided a better understanding of the metabolic reorganization that occurs in the morphological transition from yeast to mycelium.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*. Dimorphism. Proteome. Antigens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fases miceliana e leveduriforme de <i>Histoplasma capsulatum</i>	19
Figura 2 - Ciclo biológico de <i>Histoplasma capsulatum</i>	22
Figura 3 - Distribuição de casos humanos de histoplasmose publicados no Brasil no período de 1939-2018.....	24
Figura 4 - Distribuição da detecção de <i>Histoplasma capsulatum</i> no meio ambiente publicadas no Brasil até o ano de 2018.....	25
Figura 5 - Modelo esquemático da composição da parede celular da fase leveduriforme de <i>Histoplasma capsulatum</i>	27
Figura 6 - Diferenciação celular de <i>Histoplasma capsulatum</i>	56
Figura 7 - Análise dos extratos proteicos de <i>Histoplasma capsulatum</i>	57
Figura 8 - Qualidade dos peptídeos dos extratos proteicos.....	58
Figura 9 – Análise de precisão na detecção de massa.....	59
Figura 10 – Gráfico representativo da faixa de detecção dinâmica das proteínas de acordo com sua abundância e massa molecular.....	60
Figura 11 - Classificação funcional das proteínas de <i>Histoplasma capsulatum</i> identificadas com preferencial abundância nas formas de micélio e levedura.....	62
Figura 12 - Comparação de perfis proteicos relacionados à glicólise e fermentação em <i>Histoplasma capsulatum</i>	65
Figura 13 - Dosagem de etanol em micélio e levedura de <i>Histoplasma capsulatum</i> ...	66
Figura 14 - Comparação de perfis proteicos relacionados a via das pentoses-fosfato e estresse oxidativo em <i>Histoplasma capsulatum</i>	70
Figura 15 - Comparação de perfis proteicos relacionados a resposta ao estresse em <i>Histoplasma capsulatum</i>	71
Figura 16 - Análise de proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de <i>Histoplasma capsulatum</i> por <i>Western blot</i>	72
Figura 17 - Comparação de perfis proteicos relacionados a beta-oxidação, ciclo do glioxilato e do metilcitrato em <i>Histoplasma capsulatum</i>	74
Figura 18 - Ensaio de atividade da isocitrato liase.....	75
Figura 19 - Ensaio de atividade da metilcitrato sintase.....	76
Figura 20 - Comparação de perfis proteicos relacionados ao metabolismo de aminoácidos em <i>Histoplasma capsulatum</i>	81

Figura 21 - Comparação de perfis proteicos relacionados ao ciclo do ácido tricarboxílico em <i>Histoplasma capsulatum</i>	84
Figura 22 - Comparação de perfis proteicos relacionados ao metabolismo da parede celular em <i>Histoplasma capsulatum</i>	87
Figura 23 - Avaliação de componentes da parede celular de <i>Histoplasma capsulatum</i>	89
Figura 24 - Diagrama de Venn com sobreposição de proteínas identificadas por diferentes pools de soros em triplicatas experimentais.....	90
Quadro 1 - Proteínas candidatas a possíveis alvos antigênicos no diagnóstico da histoplasmose.....	91
Quadro 2 - Possíveis epítomos B identificados nas proteínas candidatas a alvos antigênicos para o diagnóstico da histoplasmose.....	92
Figura 25 - Possíveis epítomos B nas proteínas antígeno M, catalase P e YPS-3.....	93
Figura 26 – Detecção de anticorpos anti-antígeno M pelo método de ELISA indireto..	94
Figura 27 – Detecção de anticorpos anti-antígeno M pelo método de <i>Western blot</i>	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de <i>Histoplasma capsulatum</i> associadas à glicólise e fermentação.....	63
Tabela 2: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de <i>Histoplasma capsulatum</i> associadas à via das pentoses-fosfato e resposta ao estresse.....	67
Tabela 3: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de <i>Histoplasma capsulatum</i> associadas à beta-oxidação e aos ciclos do glioxilato e do metilcitrato.....	73
Tabela 4: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de <i>Histoplasma capsulatum</i> associadas ao metabolismo de aminoácidos.....	78
Tabela 5: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de <i>Histoplasma capsulatum</i> associadas ao ciclo do ácido tricarbóxico.....	83
Tabela 6: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de <i>Histoplasma capsulatum</i> associadas à composição da parede celular fúngica.....	86

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Tabela suplementar 1: Proteínas identificadas em células leveduriformes de <i>Histoplasma capsulatum</i>	126
Apêndice B - Tabela suplementar 2: Proteínas identificadas em micélio de <i>Histoplasma capsulatum</i>	142
Apêndice C - Tabela suplementar 3: Proteínas identificadas em <i>Histoplasma capsulatum</i> mais abundantes em levedura em relação a micélio.....	157
Apêndice D - Tabela suplementar 4: Proteínas identificadas em <i>Histoplasma capsulatum</i> mais abundantes em micélio em relação a levedura.....	173
Apêndice E - Tabela suplementar 5: Proteínas antigênicas identificadas em extrato proteico da fase leveduriforme de <i>Histoplasma capsulatum</i>	183

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila
ACO - Aconitase
ADH - Álcool desidrogenase (*Alcohol dehydrogenase*)
AGS - Alfa-glucana sintase (*α -glucan synthase*)
ATP - Adenosina trifosfato (*Adenosine triphosphate*)
ATP2 - Subunidade beta de F1F0-ATPase
BAD - Fator de adesão de *Blastomyces* (*Blastomyces adhesin*)
BCIP - Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*)
BSA - Soro albumina bovina (*Bovine serum albumin*)
cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CATA - Catalase A
CATB - Catalase B
CATP - Catalase P
CBP - Proteína de ligação de cálcio (*Calcium binding protein*)
CD - Grupamento de Diferenciação (*Cluster of differentiation*)
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CID - Dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation*)
CoA - Coenzima A
CON - Experimento controle
ConA - Concanavalina A
CR - Receptor de complemento (*Complement receptor*)
DHN - Di-hidroxinaftaleno (*Di-hidroxi naftaleno*)
DMP - Dimetil pimelimidato (*Dimethyl pimelimidate*)
DNA - Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
DO - Densidade Óptica
DRK1 - Histidina kinase reguladora do dimorfismo 1 (*Dimorphism regulating kinase 1*)
DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))
DTT - Ditioneitol
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
ELISA - Ensaio enzimático por imunoabsorção (*Enzyme linked immunosorbent assay*)
F6P - Frutose-6-fosfato
FITC - Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)
FunCat2 - Catálogo funcional (*The functional catalogue*)
G1P - Glicose-1-fosfato
G3P - Gliceraldeído-3-fosfato
G6P - Glicose-6-fosfato
HET - Heterólogo
HÍG - Hígido
HIS - Histoplasmosse

HSF - Fator de choque térmico (*Heat shock fator*)
HSP - Proteína de choque térmico (*Heat shock protein*)
ICL - Isocitrato liase
ID - Imunodifusão dupla de Ouchterlony
mAb - Anticorpo monoclonal
MM - Massa Molecular
MCS - Metilcitrato sintase
MIPS - Centro de informação de sequências proteicas de Munique (*The Munich Information Center for Protein Sequences*)
NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT - Tetrazolio de azul nitro (*Nitro Blue Tetrazolium*)
NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
Nano UPLC-MS^E - Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas com aquisição independente de dados (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography*)
OPD - Diclodidrato de Ortofenilenodiamina (*o-phenylenediamine dihydrochloride*)
PBS - Salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)
PBS-T - Salina tamponada com fosfato + Tween 20
PBS-TL - Salina tamponada com fosfato + Tween 20 + leite desnatado
PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)
PHB - Fosforilase B
PLGS - Servidor *ProteinLynx Global Server* (ProteinLynx Global SERVER)
PMP - Proteína da membrana do peroxissoma (*Peroxisomal Matrix Protein*)
ppm - Partes por milhão
RFC - Reação de fixação de complemento
RIA - Radioimunoensaio
RIB - 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase
RNA - Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
RNAi - Ácido ribonucleico de interferência (*Ribonucleic acid interference*)
SDS - Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)
SID - Sideróforos
SOD - Superóxido dismutase
TBS-T - Salina tamponada com Tris + Tween 20
TBS-TL - Salina tamponada com Tris + Tween 20 + leite desnatado
TCA - Ciclo do ácido tricarbóxico
TFA - Ácido trifluoroacético (*Trifluoroacetic acid*)
WGA - *Agglutinina de gérmen de trigo* (*Wheat Germ Agglutinin*)
YPS3 - Proteína específica da fase leveduriforme (*Yeast phase specific protein*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Histoplasma capsulatum</i>	18
1.2 ECOLOGIA DO FUNGO	20
1.3 A HISTOPLASMOSE	21
1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA em <i>H. capsulatum</i>	25
1.5 DIAGNÓSTICO DA HISTOPLASMOSE	31
1.6 ANÁLISES PROTEÔMICAS DE FUNGOS PATOGÊNICOS.....	33
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 ISOLADO, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DO FUNGO	42
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS PROTEICOS	42
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE MICÉLIO E LEVEDURA DE <i>H. capsulatum</i>	43
4.3.1 Digestão triptica	43
4.3.2 Aquisição de dados por NanoUPLC-MS ^E	44
4.3.3 Processamento dos espectros e identificação de proteínas	45
4.3.4 Ensaio de quantificação de etanol	46
4.3.5 Atividade da isocitrato liase (ICL).....	47
4.3.6 Dosagem da metilcitrato-sintase (MCS)	47
4.3.7 Microscopia de fluorescência.....	48
4.3.8 Análise por <i>Western blot</i>	49
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ANTÍGENOS POR ANÁLISES PROTEÔMICAS.....	50
4.4.1 Coimunoprecipitação de proteínas	50
4.4.2 Análise por espectrometria de massas	51
4.4.3 Análise de dados	52
4.4.4 Análise <i>in silico</i> de antigenicidade	53
4.4.5 Análise de reatividade frente ao antígeno M.....	53
4.4.5.1 ELISA indireto.....	54
4.4.5.2 <i>Western blot</i>	54

4.5 ASPECTOS ÉTICOS	55
5 RESULTADOS	56
5.1 DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE <i>Histoplasma capsulatum</i>	56
5.2 EXTRATOS PROTEICOS.....	57
5.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DE NANO UPLC-MS ^E	58
5.4 PROTEOMA DAS DIFERENTES FASES BIOLÓGICAS DE <i>H. capsulatum</i> ...	61
5.4.1 Características das proteínas nas formas miceliana e leveduriforme de <i>H. capsulatum</i>	61
5.4.1.1 Metabolismo de <i>H. capsulatum</i>	62
5.4.1.1.1 Glicólise e fermentação	62
5.4.1.1.2 Via das pentoses fosfato e resposta ao estresse	66
5.4.1.1.3 Beta-oxidação e ciclos do glioxilato e do metilcitrato	72
5.4.1.1.4 Metabolismo de aminoácidos	76
5.4.1.1.5 Ciclo do ácido tricarboxílico	82
5.4.1.1.6 Metabolismo de parede celular.....	85
5.5 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS ANTIGÊNICOS	89
5.5.1 Análise de reatividade frente ao antígeno M por ensaios imunoenzimáticos	94
6 DISCUSSÃO	97
7 CONCLUSÕES	109
8 PERSPECTIVAS.....	110
REFERÊNCIAS.....	111
PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O DOUTORAMENTO	124
APÊNDICE A – TABELA SUPLEMENTAR 1	126
APÊNDICE B – TABELA SUPLEMENTAR 2	142
APÊNDICE C – TABELA SUPLEMENTAR 3.....	157
APÊNDICE D – TABELA SUPLEMENTAR 4.....	173
APÊNDICE E – TABELA SUPLEMENTAR 5.....	183

1 INTRODUÇÃO

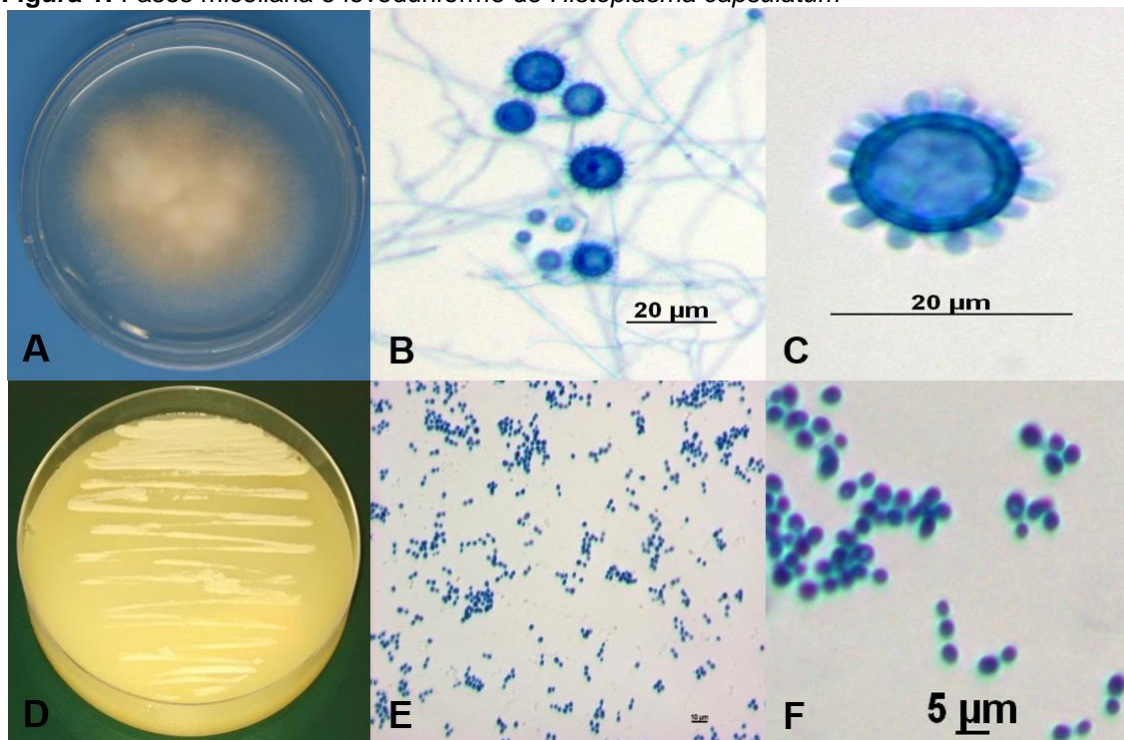
1.1 *Histoplasma capsulatum*

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum*, agente etiológico da histoplasmose clássica, é um fungo dimórfico, descrito por Samuel Taylor Darling em 1905 na região do canal do Panamá, estudando material de autópsia de um homem com doença febril e hepatomegalia (DARLING, 1906).

Uma das características importantes deste fungo é a termotolerância. Na forma miceliana (fase M), *H. capsulatum* se desenvolve a 25-28°C em seu ambiente natural ou *in vitro*, apresentando colônias brancas a acastanhadas, algodoadas. Microscopicamente, são caracterizadas por hifas hialinas, septadas, ramificadas e de morfologia típica, representada por macroconídios, geralmente esféricos (inicialmente de parede lisa), desenvolvendo com o envelhecimento da colônia, projeções semelhantes a tubérculos, e ainda microconídios ovais de paredes lisas (Figura 1).

Em sua fase leveduriforme (fase L) ou a partir de espécimes clínicos cultivados a 37°C em meios de cultura apropriados, *H. capsulatum* se apresenta como colônias de aspecto úmido, lisas e de coloração branco-amarelada; microscopicamente caracterizadas por pequenas estruturas unibrotantes, esféricas ou ovais, de paredes finas (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2013), como demonstrado na Figura 1.

Figura 1: Fases miceliana e leveduriforme de *Histoplasma capsulatum*



(A) Cultivo da fase filamentosa em meio ágar batata. (B) Aspectos microscópicos da fase miceliana com micro e macroconídios característicos (40X). (C) Detalhe do macroconídio, mostrando as projeções semelhantes a tubérculos (100X). (D) Cultivo da fase leveduriforme em meio ML-gema. (E) e (F) Aspectos microscópicos da fase leveduriforme com leveduras unibrotantes, em aumento de 10 e 40X. Coloração por lactofenol azul de algodão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Histoplasma capsulatum é um organismo eucarioto pertencente ao reino Fungi, classificado no filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Onygenales*, família *Ajellomycetaceae*, gênero *Histoplasma* (anamorfo) ou *Ajellomyces* (teleomorfo), espécie *Histoplasma capsulatum*, englobando três variedades distintas: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente da histoplasmose clássica, *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente da histoplasmose africana e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, agente etiológico da linfangite epizoótica dos equinos (HIBBETT et al., 2007; LUNBSCH; HUHNDORF, 2007; LUNBSCH et al., 2007). *H. capsulatum* var. *capsulatum* é a variedade de maior importância em nosso meio devido à sua distribuição geográfica cosmopolita, e responsável pela histoplasmose nas Américas.

Estudos de filogenia propostos por Kasuga e colaboradores (2003), baseados no sequenciamento parcial dos genes codificadores das proteínas fator de ribosilação do ADP (*arf*), precursor do antígeno H (*H-anti*), delta-9 desaturase do ácido graxo (*ole 1*) e alfa-tubulina (*tub 1*), sugere que *H.*

capsulatum sensu lato seja um complexo de pelo menos oito clados geograficamente distribuídos: NAm 1 (North American class 1), NAm 2 (North American class 2), LAm A (Latin American group A), LAm B (Latin American group B), Australian, Netherlands (Indonesian), Eurasian e African. Com exceção do clado Eurasian, os outros foram considerados espécies filogenéticas. Em 2016, Teixeira e colaboradores acrescentam a esses oito clados, pelo menos mais seis novas espécies filogenéticas, apoiados por diferentes métodos de estudo populacional baseado em filogenia e compreendendo as espécies filogenéticas LAm A1, LAm A2, LAm B1, LAm B2, RJ e BAC-1. Mais recentemente, Sepúlveda e colaboradores (2017) propuseram um rearranjo taxonômico no gênero *Histoplasma*, no qual pelo menos quatro espécies crípticas diferem tanto geneticamente quanto em virulência: *H. capsulatum sensu stricto*, *H. mississippiense*, *H. ohiense* e *H. suramericanum*.

1.2 ECOLOGIA DO FUNGO

Histoplasma capsulatum tem o solo como seu habitat (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; CORCHO-BERDUGO et al., 2011). Alguns fatores determinam a distribuição focal deste fungo na natureza, havendo geralmente associação de seu isolamento com microambientes abrigados, tais como cavernas, construções abandonadas, galinheiros, árvores ou quaisquer outros locais onde o solo possa estar enriquecido com fezes de morcegos ou galinhas e outras aves gregárias. Esta relação é devida ao alto teor de ácido úrico encontrado nestes excrementos, sendo este componente (utilizado como fonte de nitrogênio por *H. capsulatum*) imprescindível ao seu crescimento e proliferação. Além disto, tais micronichos geralmente apresentam condições de temperatura, umidade e acidez do solo ideais à sobrevivência deste microrganismo (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1986; CANO; HAJJEH, 2001).

A infecção por *H. capsulatum* já foi detectada em várias espécies animais, incluindo cães, felinos, roedores, primatas, quirópteros, marsupiais, equinos e aves (LARSH, 1975; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1986; TAYLOR et al., 1996; CANO; HAJJEH, 2001; ESPINOSA-AVILÉS, 2008; REYES-MONTES, 2009; CANTEROS et al., 2010; QUIST et al., 2011).

Entre os animais suscetíveis à infecção, o morcego exerce o papel de disseminador do fungo na natureza. Devido ao intenso parasitismo nas células da mucosa intestinal, e apresentando lesões, acabam por excretar o fungo em suas fezes, e desempenhando um importante papel na manutenção do ciclo biológico de *H. capsulatum* (TAYLOR et al., 2000; DIAS et al., 2011).

Duas variedades de *H. capsulatum* são patogênicas para o homem: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, mais encontrada no continente americano e *H. capsulatum* var. *duboisii*, encontrado nos continentes africano e europeu (WHEAT et al., 2004; KAUFFMAN, 2007; DE DEUS FILHO et al., 2009). A distribuição na natureza está associada a diversos fatores, ratificando a ideia de que o clima moderado, a umidade e as características do solo colaboram para caracterizar uma área como endêmica para *H. capsulatum* (KAUFFMAN, 2007).

1.3 A HISTOPLASMOSE

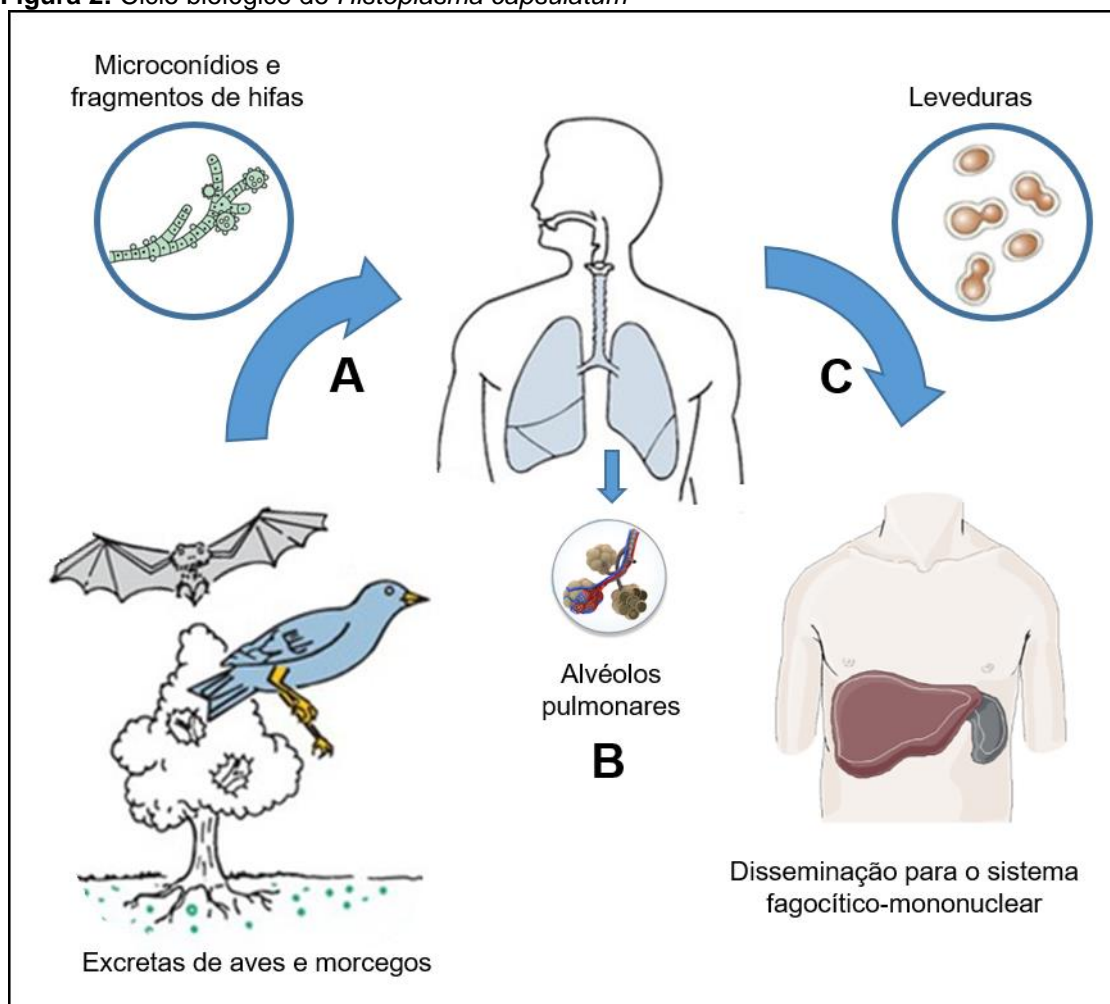
O início da infecção por *H. capsulatum* depende de uma complexa interação entre o fungo e seu hospedeiro e, pelo menos três condições podem ser determinantes no prognóstico desta micose: o estado de competência imunológica do hospedeiro, a virulência da cepa infectante e a carga parasitária adquirida (GOODWIN et al., 1981; GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006).

Com raras exceções, este fungo infecta seus hospedeiros por via respiratória através da inalação de propágulos infectantes (microconídios e pequenos fragmentos de hifas). Estas estruturas de propagação apresentam grande resistência aos fatores adversos do meio ambiente e são facilmente carregadas por correntes aéreas, dispersando-se a grandes distâncias (CHICK, 1981; FRÍAS-DE-LEÓN, 2017).

Os microconídios são os elementos infectantes mais frequentes por possuírem tamanho reduzido (2-5µm), penetrando facilmente os alvéolos pulmonares, assim como destacam-se das hifas com mais facilidade (LARSH; BARTELS, 1970). Este evento é seguido pela conversão destas partículas em leveduras, o que tem sido considerado como fator crítico para a patogenicidade de *H. capsulatum* (LÓPEZ, 2006; ARAVALLI et al., 2008). Nos alvéolos, estes

organismos se incorporam ao parênquima pulmonar através da migração de macrófagos alveolares, bem como de polimorfonucleares, determinando pneumonia intersticial. Durante a infecção primária, as células leveduriformes são fagocitadas, levando à ativação do sistema fagocítico mononuclear e liberação de mediadores químicos participantes do mecanismo oxidativo. Fagócitos repletos de *H. capsulatum* migram então para os linfonodos adjacentes, onde novo foco inflamatório é formado, constituindo complexo primário pulmonar. Posteriormente, pode haver disseminação hematogênica/linfática para outros órgãos, tais como fígado, baço e medula óssea (Figura 2).

Figura 2: Ciclo biológico de *Histoplasma capsulatum*



(A) Inalação de propágulos infectantes presentes no solo rico em excretas de aves e morcegos; (B) Deposição dos propágulos fúngicos nos alvéolos pulmonares e conversão à fase leveduriforme; (C) Possibilidade de disseminação hematogênica para outros órgãos.
 Fonte: Adaptado de MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008.

Esta micose apresenta um amplo espectro clínico, variando desde formas leves a graves e disseminadas. Em sua maioria, os indivíduos apresentam um quadro respiratório inespecífico, autolimitado e benigno, que desaparece deixando uma reação de hipersensibilidade aos antígenos do fungo, podendo passar até mesmo sem diagnóstico na rotina clínica (GURNEY; CONCES, 1996). Segundo Wheat e Kauffman (2003), a histoplasmose causada por *H. capsulatum* é assintomática em 50 - 90% dos casos.

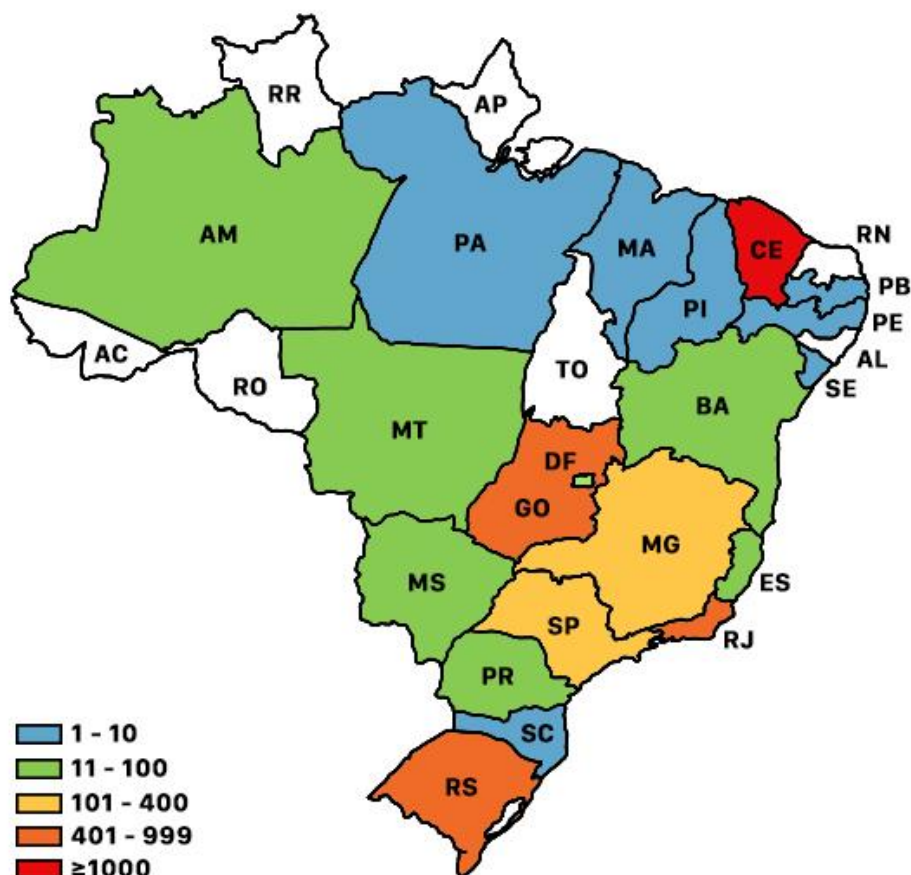
A histoplasmose pode ficar restrita aos pulmões ou ocorrer disseminação para os linfonodos mediastinais e todo o sistema fagocítico-mononuclear, acometendo vários órgãos, como baço, fígado, medula óssea, entre outros. A histoplasmose pulmonar aguda é observada em casos isolados ou sob a forma de surtos epidêmicos, em pessoas que realizam atividades recreativas ou laborais, em locais onde há micronichos do fungo (KAUFFMAN, 2007). Em indivíduos com lesões pulmonares pré-existentes, como enfisema centrolobular ou bolhoso, ou defeitos anatômicos estruturais, a histoplasmose pode ocorrer sob a forma pulmonar crônica (GOODWIN; DES PREZ, 1973). A forma disseminada da histoplasmose ocorre principalmente em indivíduos com algum mecanismo de imunossupressão, como pacientes com neoplasias hematológicas, transplantados, em uso prolongado de corticosteróides e pessoas vivendo com aids, além das faixas etárias extremas (crianças e idosos). Esta é uma forma clínica definida pela presença de foco extrapulmonar e extraganglionar de curso progressivo (KUROWSKI; OPSTAPCHUK, 2002; WHEAT et al., 2004).

Como a histoplasmose não é uma doença de notificação compulsória em todo o território nacional, apenas no estado de Goiás, os dados de incidência no Brasil são imprecisos, sendo sua casuística nacional quase que na totalidade oriunda de relatos de caso publicados na literatura científica especializada.

Uma busca na literatura dos casos de histoplasmose no Brasil de 1939 a 2018 revelou 207 artigos, os quais apresentam casos desta micose em quase todo o território nacional. Somente sete estados brasileiros não possuem relatos de caso de histoplasmose humana publicados em artigos científicos: Acre, Alagoas, Amapá, Rio Grande do Norte, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 3). Desta forma, os relatos de histoplasmose no Brasil suportam que a histoplasmose é uma das micoses sistêmicas mais comuns no país, com uma

prevalência significativa, ocorrendo com maior frequência nas regiões sudeste, sul, centro-oeste e nordeste (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006; PRADO et al., 2009).

Figura 3: Distribuição de casos humanos de histoplasmose publicados no Brasil no período de 1939-2018

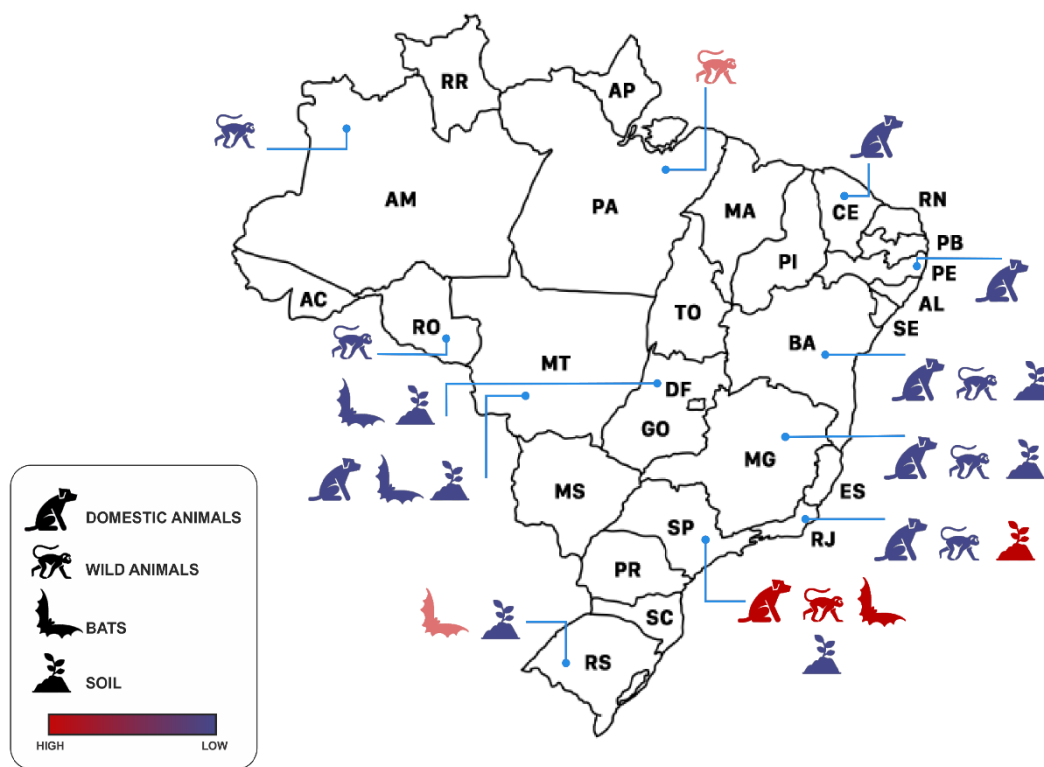


Número de casos de histoplasmose humana no Brasil obtido através de revisão sistemática da literatura no período de 1939-2018, totalizando 3.530 casos.

Fonte: ALMEIDA et al. (dados não publicados).

Microepidemias de histoplasmose já foram relatadas em oito estados brasileiros e no Distrito Federal (COLOMBO et al., 2011). A comprovação do fungo no meio ambiente também já foi demonstrada, com isolamento de *H. capsulatum* no solo de seis estados brasileiros mais o Distrito Federal, e isolamento do fungo de morcegos, animais domésticos e silvestres das cinco regiões geográficas do país (Figura 4).

Figura 4: Distribuição da detecção de *Histoplasma capsulatum* no meio ambiente publicadas no Brasil até o ano de 2018



Relatos de isolamento de *H. capsulatum* no solo, em animais domésticos e selvagens, e especificamente morcegos que desenvolvem importante papel na dispersão do fungo no ambiente.

Fonte: ALMEIDA et al. (dados não publicados).

1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA em *H. capsulatum*

Têm sido descritos na literatura especializada vários fatores de virulência em fungos, responsáveis pela sua sobrevivência em parasitismo. Alguns são bem determinados, como componentes específicos da parede celular, responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, produção de fosfolipases, proteases e elastases, capazes de causar dano tecidual e quebrar as defesas do hospedeiro. E ainda, a produção de catalases, enzimas que decompõem H_2O_2 em H_2O e O_2 , atuando contra os mecanismos oxidativos, tornando a fagocitose por células efectoras dos hospedeiros mais eficiente (BRUMMER; STEVENS, 1984; GAUTHIER, 2017). Além disso, a capacidade de fazer transição a várias vias metabólicas fundamentais para a sobrevivência

intracelular e para a termotolerância, pré-requisito para a disseminação hematogênica, são fatores fundamentais.

Fungos dimórficos, dentre eles *H. capsulatum*, fazem morfogênese conforme o ambiente em que se encontram (IGNATOV; KEATH, 2002). A capacidade de fazer dimorfismo é um aspecto importante na patogênese, pois a forma filamentosa é infecciosa, mas é a forma leveduriforme que sobrevive intracelularmente causando doença (NEMECEK; WUTHRICH; KLEIN, 2006). A mudança fenotípica de micélio para levedura resulta em uma mudança tanto na morfologia celular, quanto na composição da parede celular, na presença de estruturas antigênicas e na expressão de fatores de virulência (KLEIN, TEBBETS, 2007; SHEN; RAPPLEYE, 2017).

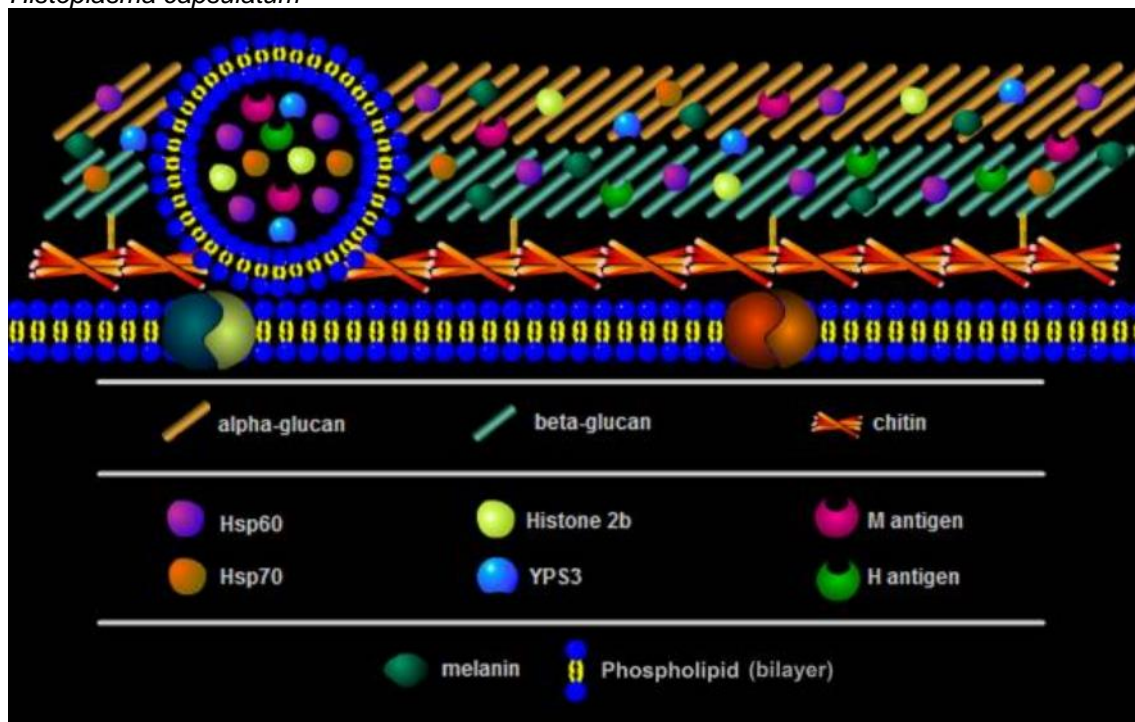
A mudança de temperatura de 25°C para 37°C é estímulo suficiente para o dimorfismo, mas outras condições ambientais como presença de cisteína e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) podem influenciar na morfogênese de *H. capsulatum* (MARESCA; KOBAYASHI, 2000). Já foi demonstrado também que a enzima híbrida histidina quinase 1 (DRK - *Dimorphism regulating kinase*) funciona como um regulador global de dimorfismo e virulência em *H. capsulatum* e outros fungos dimórficos. Experimentos de disrupção gênica, com a inativação do gene *DRK1*, causaram um bloqueio na transição dimórfica regulada por temperatura de micélio para levedura, impedindo a expressão de vários genes relacionados à virulência específica de levedura. Esta enzima também regula a integridade da parede celular, a esporulação e a expressão de alguns genes associados à virulência dos fungos (NEMECEK; WUTHRICH; KLEIN, 2006). Em outro estudo, foi identificado como essencial para a transição micélio-levedura o gene *RYP1*. A análise de microarranjo demonstrou que *RYP1* atua como regulador transcricional de diversos genes expressos na fase L, incluindo genes ligados à virulência (NGUYEN; SIL, 2008).

Componentes extracelulares e de superfície também atuam na fase leveduriforme de *Histoplasma*, funcionando potencialmente na virulência deste fungo. À medida que α -(1,3)-glucanas são expressas como a camada mais externa da parede celular, elas bloqueiam o reconhecimento inato das β -1,3-glucanas pelo receptor dectina-1 em fagócitos hospedeiros (RAPPLEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007). Quando ligada à superfície da célula, a proteína de choque térmico (HSP - *Heat shock protein*) de 60 kDa promove

suporte para a ligação entre a levedura e o macrófago hospedeiro. Foi verificado que a proteína YPS3 promove disseminação da levedura no sítio de infecção pulmonar por algumas cepas de *Histoplasma*, (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008).

A parede celular de *H. capsulatum* é formada principalmente por quitina, α -1,3-glucana e β -1,3-glucana (Figura 5). A quantidade de quitina é superior neste fungo, quando comparado a outros fungos dimórficos. Entretanto, existem diferenças na composição de glucanas nas duas fases: α -1,3 glucana, o principal componente da fase leveduriforme é um polissacarídeo de parede celular comum para a maioria dos fungos de importância médica, enquanto que na fase filamentosa é β -1,3-glucana (HEARN, 1997). A presença de altos níveis de α -1,3-glucana está associada com a virulência do isolado (HOGAN; KLEIN, 1994). Entretanto, Hearn (1997) sugere a possibilidade de um mesmo isolado passar do fenótipo α -1,3-glucana (+) para α -1,3-glucana (-), o que explicaria a existência das formas crônica e latente da histoplasmose.

Figura 5: Modelo esquemático da composição da parede celular da fase leveduriforme de *Histoplasma capsulatum*



Fonte: Adaptado de GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011.

Estudos de deleção de gene codificador de α -(1,3)-glucana (α -1,3-glucana sintase) confirmaram que *H. capsulatum* requer α -(1,3)-glucana como

fator de virulência. Este fator foi evidenciado por Rappleye e colaboradores (2004) após desenvolverem um sistema para interferência de RNA (RNAi) em *H. capsulatum* com inibição de α -(1,3)-glucana sintase (AGS1). A redução da atividade de AGS1 por RNAi ou substituição alélica tradicional reduziu substancialmente a colonização pulmonar por *H. capsulatum* e sua habilidade de proliferar dentro dos macrófagos em cultura e destruí-los. A α -(1,3)-glucana parece ser um determinante de virulência designado especificamente para sobrevivência e replicação no pulmão, uma vez que a perda de α -(1,3)-glucana não prejudica o crescimento de *H. capsulatum in vitro*. Perda espontânea de α -(1,3)-glucana em outros fungos dimórficos também está correlacionada à diminuição da virulência nestes microrganismos, sugerindo que este pode ser um mecanismo conservado de patogenicidade dos fungos (HOGAN; KLEIN, 1994). Como β -glucanas são componentes essenciais da parede celular, α -(1,3)-glucana pode contribuir para sobrevivência da levedura através da proteção da camada de β -glucana da detecção por células do hospedeiro. Consistente com isto, frações de parede de fungos dos gêneros *Histoplasma* e *Paracoccidioides*, contendo β -glucana, promovem recrutamento de células e estimulam produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF α (MEDEIROS et al., 2004).

A proteína ligadora de cálcio (CBP - *Calcium Binding Protein*), uma proteína ligante de cálcio secretada pelas células fúngicas durante a fase L de *H. capsulatum*, é um importante fator de virulência. A realização de experimentos de disrupção gênica, com a deleção do gene *CBP1*, demonstrou que as leveduras resultantes não cresceram quando privadas de cálcio, e também não foram capazes de destruir os macrófagos *in vitro* ou se proliferar em um modelo de infecção animal (BATANGHARI et al., 1998; SEBGHATI et al., 2000).

Leveduras de *H. capsulatum* produzem ainda uma proteína específica da fase leveduriforme (YPS3 - *Yeast phase specific*), uma proteína localizada na parede celular e que possui homologia com um fator de adesão de *Blastomyces dermatitidis* (BAD1 - *Blastomyces adhesin*). Semelhante a BAD1, a proteína YPS3 interage com a quitina na parede celular de levedura de *H. capsulatum* (BOHSE; WOODS, 2005). Bohse e Woods (2007) descrevem que na levedura (*H. capsulatum* G217B) em que a produção de YPS3 foi bloqueada por RNAi, o crescimento *in vitro* foi semelhante à cepa selvagem e, ainda, apresentou

virulência semelhante em modelo de infecção utilizando macrófagos murinos. Porém, em infecção animal experimental, os mutantes apresentaram diminuição significativa da carga fúngica no fígado e no baço, sugerindo a importância da YPS3 na progressão da doença disseminada.

Ainda pouco se sabe sobre os genes necessários para a replicação intracelular no hospedeiro. Uma vez que a aquisição de ferro é considerada um fator de virulência para muitos agentes patogênicos, foi investigada também a função da aquisição de ferro na patogênese de *H. capsulatum*. Este fungo adquire ferro através da ação da enzima redutase férrica e produção de sideróforos (SID), necessitando de *SID1*, membro de um grupo de genes sideróforos regulado por ferro, para colonização do hospedeiro. A inativação de *SID1* através de deleção do gene ou silenciamento de RNAi anulou a biossíntese de sideróforos, restringiu o crescimento sob condições limitadas de ferro *in vitro* e proporcionou diminuição da virulência em modelos de infecção, fornecendo a primeira demonstração molecular para o papel de sideróforos de *H. capsulatum* na aquisição de ferro e na patogênese (HWANG et al., 2008; HILTY et al., 2011).

A importância dos mecanismos de aquisição de ferro de *H. capsulatum*, incluindo atividades mediadas por sideróforos, foi demonstrada por abordagens de identificação e manipulação de genes. Outros estudos apontaram a limitação de zinco pelos macrófagos hospedeiros como outra estratégia importante de defesa do hospedeiro (WINTERS et al., 2010; SUBRAMANIAN VIGNESH et al., 2013).

Melaninas são polímeros hidrofóbicos já descritos como fator de virulência em várias espécies fúngicas. Algumas das suas funções estão relacionadas à defesa contra estresses ambientais e parasitários, como radiação ultravioleta, agentes oxidantes e agentes antifúngicos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006; TABORDA et al., 2008). Dentre os fungos que têm a capacidade de produzir melanina durante a infecção, encontra-se *H. capsulatum* que, quando crescido em meio quimicamente definido, produz conídios e leveduras acastanhadas. Na presença de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) ou epinefrina, produz células melanizadas, sendo ainda reconhecida *in vivo* em ensaios utilizando anticorpos monoclonais e soros policlonais, indicando que a melanina pode ter um papel importante na patogenia da histoplasmose (NOSANCHUK et al., 2002). Em meio de cultura contendo L-tirosina, leveduras produzem um pigmento solúvel de

coloração acastanhada a preta compatível com piomelanina. No entanto, culturas de micélio não são capazes de produzir piomelanina sob as mesmas condições. Uma vez que a piomelanina é produzida na forma parasitária, este pigmento pode estar envolvido na virulência do fungo (ALMEIDA-PAES et al., 2017). Desta forma, a melanina presente na parede celular de *H. capsulatum* o protege de inúmeras adversidades ambientais e a natureza polimérica do pigmento aumenta a sua força estrutural (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011).

A ligação e a fagocitose de partículas, como agentes patogênicos microbianos, pelas células imunes do hospedeiro são frequentemente associadas ao estresse oxidativo e nitrosativo. A resistência ao estresse oxidativo ou nitrosativo é um potencial mecanismo patogênico, uma vez que já foi descrito que *H. capsulatum* é capaz de expressar atividade de catalase degradante de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (HOWARD, 1983) e atividade de oxidase alternativa mitocondrial (JOHNSON et al., 2003), que poderiam promover a sobrevivência sob condições de estresse oxidativo.

Foram identificadas em *H. capsulatum* uma enzima óxido nítrico redutase (CHAO et al., 2008) e uma superóxido dismutase (HOLBROOK et al., 2011; YOUSEFF et al., 2012) que poderiam fornecer resistência ao estresse oxidativo e/ou nitrosativo, além de três catalases diferentes: CATA, CATB e CATP. Durante o crescimento de *H. capsulatum*, CATB e CATP são constitutivamente expressas. Já CATA está presente na fase filamentosa e/ou quando exposta a H₂O₂. Tem sido sugerido que CATP pode facilitar a destoxificação ao H₂O₂ durante o metabolismo (JOHNSON et al., 2002). Posteriormente, nosso grupo sugeriu que a atividade de catalase de *H. capsulatum* está ligada principalmente ao antígeno M (CATB), uma vez que este se localiza na superfície celular em ambas as fases do ciclo evolutivo, sendo possivelmente o responsável pela evasão ao estresse oxidativo e permitindo a conversão do fungo da fase miceliana para a leveduriforme (GUIMARÃES et al., 2008).

Fungos patogênicos, como a maioria dos microrganismos, possuem prováveis adesinas específicas que permitem que esses patógenos possam aderir à célula hospedeira ou à matriz extracelular. Leveduras e conídios de *H. capsulatum* não opsonizados se ligam a macrófagos através do receptor do complemento tipo 3 (CR3) (BULLOCK; WRIGHT, 1987). Usando CR3 em extrato

de parede celular de *Histoplasma*, Long e colaboradores (2003) identificaram HSP60 de *Histoplasma capsulatum* como um ligante e potencial adesina detectada na superfície da célula de levedura. HSP60 pode ainda aumentar a sobrevivência celular sob condições de estresse fisiológico (SHANER et al., 2008); em *H. capsulatum*, esta proteína pode ainda ser alvo chave da resposta imune celular durante a histoplasmose. Além disso, foi demonstrado que camundongos imunizados com esta proteína tiveram ação protetora da mesma (GOMEZ et al. 1995).

Outra proteína de choque térmico localizada na superfície celular de *H. capsulatum* é a HSP70, expressa pelo fungo quando submetido à transição de micélio-levedura, tendo seu pico de expressão a 37°C. Assim como a HSP82, também está associada à virulência, embora por mecanismos desconhecidos, exibem um padrão de expressão semelhante ao da HSP60 (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011). De uma forma geral, HSPs estão intimamente envolvidas na transição dimórfica de fungos patogênicos, particularmente em resposta a estresses associados a temperaturas mais elevadas (CLEARE; ZAMITH-MIRANDA; NOSANCHUK, 2017).

Histona 2B, outra proteína descrita na parede celular de *H. capsulatum*, um antígeno de 17 kDa, o qual Nosanchuk e colaboradores (2003) sugerem ser uma proteína importante na sinalização celular e na modulação da resposta imune pelo fungo. A administração de anticorpos monoclonais (mAbs) que se ligam à histona 2B na superfície de *H. capsulatum* mostrou reduzir a carga fúngica, diminuir a inflamação pulmonar e prolongar a sobrevivência do fungo em um modelo de infecção murino (NOSANCHUK, 2005).

1.5 DIAGNÓSTICO DA HISTOPLASMOSE

O diagnóstico da histoplasmose baseia-se nos aspectos clínicos, laboratoriais, radiológicos e epidemiológicos, uma vez que sua sintomatologia é inespecífica. Com isso, é fácil compreender a necessidade de métodos diagnósticos específicos, mantendo as evidências clínicas como suporte e guia para os demais diagnósticos (WHEAT et al., 2004; ROSSINI; GOULART, 2006; HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008).

O padrão de referência para o diagnóstico da histoplasmose é a identificação de *H. capsulatum* em materiais biológicos pelo exame direto e/ou cultivo. No entanto, o exame direto apresenta baixa sensibilidade e o isolamento e identificação do fungo em cultivo apresentam limitações, uma vez que esses processos podem ser lentos, variando de seis a doze semanas até o resultado final conclusivo. Posteriormente deve-se obter a comprovação do dimorfismo fúngico, o que nem sempre é conseguido laboratorialmente, dependendo da cepa (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006; MAUBON et al., 2007).

Diversos métodos imunológicos podem ser empregados no auxílio ao diagnóstico da histoplasmose, com níveis de sensibilidade e especificidade distintos, a depender até mesmo da forma clínica da doença. Alguns dos testes disponíveis são a imunodifusão dupla de *Ouchterlony* (ID), reação de fixação do complemento (RFC), radioimunoensaio (RIA), aglutinação em partículas de látex e ensaios imunoenzimáticos (ELISA e *Western blot*). Os dois métodos mais utilizados até recentemente para a detecção de anticorpos em amostras biológicas são a ID e a RFC, geralmente realizados em laboratórios de referência, devido à conveniência, disponibilidade e precisão desses ensaios (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA 2006; SCHEEL; GOMEZ, 2014).

Um ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) indireto foi avaliado como método para detecção de anticorpos contra histoplasmina, um complexo antigênico obtido de filtrado de cultura de *H. capsulatum* na forma miceliana. Histoplasmina glicosilada e deglicosilada foi utilizada, apresentando melhor sensibilidade (92%) e especificidade (96%) quando deglicosilada, podendo atuar como uma metodologia auxiliar aos métodos de diagnóstico existentes, podendo ser aplicada mesmo em situações em que as instalações do laboratório sejam relativamente limitadas (GUIMARÃES et al., 2004). Este ensaio foi avaliado ainda em pacientes com diferentes formas clínicas da histoplasmose, demonstrando boa sensibilidade (GUIMARÃES et al., 2010).

O teste de *Western blot* utilizando o antígeno histoplasmina purificado e deglicosilado foi desenvolvido, avaliado e validado, apresentando ótima sensibilidade e especificidade, além de rapidez e simplicidade de execução (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1994; PIZZINI et al., 1999; ALMEIDA et al., 2016),

podendo também ser utilizado em pacientes com HIV/aids (ALMEIDA et al., 2018).

Testes de detecção de antígenos são particularmente úteis para o diagnóstico de histoplasmose disseminada em pessoas vivendo com aids cujos títulos de anticorpos são baixos ou ausentes. Estes testes fornecem resultados confiáveis e altamente sensíveis para o diagnóstico da histoplasmose. Durante a infecção por *H. capsulatum*, o antígeno pode ser liberado pelas células fúngicas e detectadas em fluidos corporais como soro, urina, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural e lavado broncoalveolar. A combinação de testes de detecção de antígenos em urina e soro aumenta a sensibilidade geral. Uma limitação para esses testes é a reatividade cruzada significativa com outras infecções fúngicas, incluindo paracoccidiodomicose, blastomicose, peniciliose, coccidiodomicose e aspergilose (SCHEEL; GOMEZ, 2014; AZAR; HAGE, 2017).

Técnicas de biologia molecular têm contribuído para o desenvolvimento de abordagens que detectem indiretamente *H. capsulatum* em espécimes clínicos por meio da identificação de ácidos nucleicos específicos. Embora ofereçam maior rapidez, bem como alta sensibilidade e especificidade, além de facilidade na interpretação de resultados, ainda não existem sistemas comercialmente disponíveis para a detecção de DNA de *H. capsulatum* em amostras clínicas humanas. Mesmo havendo esforços e recursos investidos no desenvolvimento de técnicas moleculares, é necessário um consenso sobre a padronização, juntamente com a validação de grandes estudos prospectivos, para permitir a adoção generalizada destas metodologias (SCHEEL; GOMEZ, 2014; FALCI et al., 2017).

1.6 ANÁLISES PROTEÔMICAS DE FUNGOS PATOGÊNICOS

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez em 1994 por Marc Wilkins em um simpósio sobre eletroforese 2D e apareceu em impressão em 1995, com a publicação de parte de sua tese de doutorado. Inicialmente, Wilkins usou o termo para descrever a totalidade de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo (WILKINS, 2009). Esse conceito foi ampliado em estudos proteômicos empregados em análise simultânea de misturas complexas de

proteínas com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas de expressão proteica de diversos materiais, como por exemplo, produtos de lisados celulares e extratos de tecidos (WESTERMEIER; NAVEN, 2002). Pastorelli e colaboradores (2006) descrevem que a utilização de metodologias proteômicas pode auxiliar na identificação de proteínas envolvidas no processo de interação parasito-hospedeiro.

Segundo Pitarch e colaboradores (2003), estudos proteômicos têm contribuído para um melhor conhecimento de fungos patogênicos humanos no que diz respeito aos processos envolvidos na morfogênese, virulência e resposta ao hospedeiro, além de desenvolvimento de potenciais alvos antifúngicos e abordagens terapêuticas. Técnicas proteômicas podem ainda identificar e caracterizar marcadores biológicos de um determinado patógeno, auxiliando no diagnóstico precoce, no acompanhamento do tratamento de doenças e no desenvolvimento de vacinas (CASH et al., 2002).

Posteriormente, utilizando eletroforese bidimensional em gel associada à cromatografia líquida de alto desempenho e à espectrometria de massas, foi avaliada a abundância e a expressão diferencial de proteínas na fase de esférula e micélio de *Coccidioides posadasii* com a intenção de identificar potenciais candidatas à vacina. Uma proteína abundante em esférulas, identificada como Pmp1, mostrou homologia com alérgenos de *Aspergillus fumigatus* e outros fungos, todos os quais exibem semelhança com tiol-peroxidases de leveduras. A Pmp1 recombinante foi reativa com soro de indivíduos com coccidioidomicose aguda e prolongada e sugere proteção em dois modelos murinos de infecção com *C. posadasii*. Estes resultados demonstram a utilidade da análise proteômica como um ponto de descoberta para antígenos protetores para possível inclusão em uma vacina candidata para prevenção da coccidioidomicose (ORSBORN et al., 2006).

A formação do biofilme contribuindo para a resistência a antifúngicos é um dos fatores de virulência mais estudados em *Candida glabrata* (TUMBARELLO et al., 2007). Baseado nessa informação, análises proteômicas foram realizadas a fim de avaliar os perfis de proteínas diferenciais de *C. glabrata* crescido sob a forma de biofilme e em suspensão. O proteoma do biofilme de *C. glabrata* quando comparado ao proteoma planctônico demonstrou uma regulação positiva das proteínas de resposta ao estresse, o que pode potencialmente contribuir

para a maior resistência antifúngica observada, enquanto as enzimas da via glicolítica foram reguladas de forma negativa (SENEVIRATNE et al., 2010).

A aspergilose invasiva causada por *A. fumigatus* é uma infecção pulmonar ou sistêmica potencialmente fatal no hospedeiro imunocomprometido. Na tentativa de identificar as proteínas mais expressas durante a aspergilose invasiva, foi realizada uma experimentação animal e o proteoma antigênico fúngico celular que mediou essa resposta foi investigado. Foram identificadas 59 diferentes proteínas relacionadas à via glicolítica, ao estresse oxidativo e à parede celular, podendo representar não apenas valiosos marcadores de infecção, mas também possíveis candidatos a vacina contra a aspergilose (ASIF et al., 2010).

A termotolerância de *A. fumigatus* é uma das características atribuídas à patogenicidade, permitindo que o fungo cresça sob temperaturas acima da de um hospedeiro humano febril. Para elucidar os mecanismos de resistência ao calor, o proteoma de *A. fumigatus* foi analisado durante uma mudança de temperatura de 30°C para 48°C. Estas análises revelaram que a regulação de HSF1 (*Heat shock fator*) está envolvida na síntese de manitol, tradução, organização do citoesqueleto e divisão celular em *A. fumigatus* (ALBRECHT et al., 2010).

Estudando o modelo *Talaromyces marneffe*, Xi e colaboradores (2007) avaliaram a expressão diferencial de proteínas nas fases de micélio e levedura e relataram que, dos milhares de proteínas identificadas, cerca de 500 demonstraram perfis de expressão diferencial entre as duas fases. Utilizando a mesma metodologia, Chandler e colaboradores (2008) demonstraram que as proteínas encontradas comuns às fases do micélio e levedura de *T. marneffe* incluíram proteínas ligadas à transdução de sinal, produção de energia e proteção contra radicais de oxigênio, bem como proteínas relacionadas ao metabolismo em geral. A maioria das proteínas específicas de micélio possuíam funções semelhantes. No entanto, proteínas com expressão aumentada na fase leveduriforme estavam envolvidas em respostas de choque térmico, metabolismo em geral e biossíntese de parede celular.

No modelo *Paracoccidioides*, abordagens proteômicas vêm sendo utilizadas para estudar a transição dimórfica (REZENDE et al., 2011), o comportamento mediante privação de ferro e zinco (PARENTE et al., 2011; DE

CURCIO et al., 2017), analisar comparativamente o secretoma e proteínas da parede celular de micélio e levedura (WEBER et al., 2012; ARAÚJO et al., 2017), dentre outros estudos.

Para a comparação do proteoma entre as fases de desenvolvimento de *Paracoccidioides* foram utilizadas as técnicas de eletroforese bidimensional acoplada à identificação por espectrometria de massas, analisando os proteomas das formas miceliana, leveduriforme e de transição dimórfica. Este estudo identificou 81 proteínas diferencialmente abundantes nas três fases do ciclo biológico do fungo. Na fase de micélio, a ocorrência de superóxido dismutase e peroxirredoxina mitocondrial foi mais abundante. No estágio de transição dimórfica, enzimas envolvidas na via glicolítica, estavam aumentadas, assim como proteínas de choque térmico e ATP sintase. Proteínas preferencialmente abundantes na fase leveduriforme foram relacionadas à via glicolítica, ao ciclo do glioxilato e ao metabolismo de lipídeos. Esses dados demonstram que o fungo promove um remodelamento do seu metabolismo durante a transição morfológica (REZENDE et al., 2011).

A capacidade de adquirir ferro pelos patógenos, a partir de fontes disponíveis no organismo hospedeiro, é considerada um fator de virulência. Desta forma, utilizando ferramentas proteômicas, as proteínas citoplasmáticas de *Paracoccidioides* sob restrição do íon ferro foram analisadas. Como resultados, enzimas da via glicolítica foram induzidas, enquanto que várias enzimas dos ciclos do ácido tricarboxílico, do glioxilato e do metilcitrato, além de proteínas da cadeia transportadora de elétrons mostraram-se reprimidas sob privação de ferro. Esses dados sugerem uma remodelação do metabolismo de *Paracoccidioides brasiliensis*, priorizando caminhos independentes de metabolismo de ferro durante a limitação do micronutriente (PARENTE et al., 2011).

O secretoma das fases de micélio e levedura de *Paracoccidioides sp.* foi analisado, uma vez que, proteínas extracelulares representam mediadores importantes da interação parasito-hospedeiro. Utilizando uma abordagem proteômica combinando eletroforese bidimensional com espectrometria de massas, foram identificadas 24 e 30 proteínas/isoformas diferencialmente secretadas por levedura e micélio, respectivamente. As análises *in silico* mostraram que 65% das proteínas extracelulares foram secretadas por vias não

convencionais indicando ser esta a principal via de exportação de proteínas neste fungo. Adicionalmente, foi investigada a influência da inibição da secreção proteica em leveduras durante a fagocitose por macrófagos. E a adição de Brefeldina A ao meio de cultura diminuiu significativamente a produção de proteínas secretadas e de leveduras internalizadas por macrófagos. No entanto, as proteínas detectadas no secretoma de *P. lutzii* também foram identificadas nos macrófagos, indicando que a secreção de proteínas por *Paracoccidioides* pode facilitar a invasão/colonização do fungo no hospedeiro (WEBER et al., 2012).

Em *Candida albicans* foram estudadas as alterações na expressão das proteínas citoplasmáticas durante a transição dimórfica de levedura para hifa. Utilizando ferramentas proteômicas, foram detectadas proteínas citoplasmáticas de diferentes vias metabólicas envolvidas no estabelecimento e na manutenção da morfologia celular. As principais alterações detectadas como significativas foram as diferentes maneiras utilizadas pelas leveduras e hifas para obtenção de energia. Nas hifas ocorreu uma diminuição em todas as proteínas diferencialmente abundantes detectadas relacionadas ao processo de respiração: aconitase (ACO1), subunidade beta de F1F0-ATPase (ATP2) e 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase (RIB3). De forma contrária, um aumento da álcool desidrogenase (ADH1), envolvida na fermentação alcoólica, foi detectado em células de hifas (MONTEOLIVA et al., 2011).

Em *Histoplasma capsulatum* também foi estudada a aquisição de ferro a partir de fontes disponíveis no organismo hospedeiro, como um fator de virulência. Usando eletroforese bidimensional combinada a análises estatísticas, foram identificadas 42 proteínas cuja abundância foi significativamente modulada quando as concentrações de ferro foram reduzidas. Em sua maioria, essas proteínas identificadas desempenhavam importante papel na via glicolítica, no ciclo do ácido tricarboxílico, no metabolismo da lisina e síntese protéica. Algumas dessas proteínas identificadas em *H. capsulatum* sensíveis à redução do nível de ferro ainda não haviam sido relacionadas à disponibilidade de ferro em outros agentes patogênicos. Esses resultados sugerem uma necessidade de *H. capsulatum* por induzir funções metabólicas específicas para lidar com condições hostis fornecidas pelo hospedeiro (WINTERS et al., 2008).

Muitos esforços têm sido realizados com o intuito de identificar fatores que contribuam para a virulência em *Histoplasma capsulatum*. Desta forma, Holbrook e colaboradores (2011) descreveram o proteoma extracelular utilizando análise por espectrometria de massas das proteínas de filtrados de cultura da fase patogênica de *Histoplasma*. Além de CBP1, o proteoma extracelular de levedura de *Histoplasma* revelou outras 33 proteínas. A reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCR) em tempo real revelou que a expressão de 10 dos fatores extracelulares identificados estavam particularmente mais abundantes em células de levedura em comparação com micélio, sugerindo que essas proteínas estão ligadas à patogênese de *Histoplasma capsulatum*.

Em estudo recente, Xie e colaboradores (2017) relataram pela primeira vez o perfil global de succinilação de lisina, com 463 sítios de modificação em 202 proteínas de *H. capsulatum* identificadas, acoplando uma metodologia de afinidade utilizando um anticorpo anti-succinilisina à espectrometria de massas. Os resultados mostraram que essas proteínas succiniladas estão envolvidas principalmente no metabolismo central e síntese proteica, consistente com os relatos anteriores. Foram inicialmente relatados 13 sítios de succinilação de lisina em histonas (H) incluindo H2A, H2B, H3 e H4 em *H. capsulatum*. Isso representa um recurso importante para abordar a função da succinilação de lisina em *H. capsulatum*. A succinilação de lisina demonstrou recentemente desempenhar um papel crítico na regulação do metabolismo de *C. albicans* (ZHENG et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

A histoplasmose é uma doença de distribuição mundial e endêmica no continente americano, inclusive no Brasil (WHEAT et al., 2016; COLOMBO et al., 2011). Em nosso país, é uma doença negligenciada, de notificação compulsória apenas no estado de Goiás. Não se sabe ao certo o número de casos da doença no país e os dados existentes só podem ser baseados em relatos da literatura.

A pandemia do HIV e o uso crescente de medicamentos imunossupressores, resultaram em mais casos de histoplasmose e melhor compreensão da distribuição global desse fungo (ASSI et al., 2013; NACHER et al., 2013). Em indivíduos imunocompetentes, a histoplasmose geralmente é uma infecção benigna e autolimitada. No entanto, em imunodeprimidos, a infecção representa doença de alta gravidade e com sério risco de disseminação (FERREIRA; BORGES, 2009).

Os principais antígenos para diagnóstico imunológico de *H. capsulatum* são os antígenos H e M, os quais provocam tanto resposta humoral e resposta mediada por células T (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011). No entanto, os métodos disponíveis ainda apresentam limitações, e a descoberta de novos alvos antigênicos seria fundamental para melhoria do diagnóstico da histoplasmose e possível desenvolvimento de vacinas, uma vez que ainda não há vacina disponível contra este fungo.

A diferenciação entre duas formas morfológicas distintas, ou seja, a capacidade de um fungo existir como micélio ou levedura é definida como dimorfismo (RAPPEYE; GOLDMAN, 2006). O dimorfismo é considerado um dos aspectos mais importantes na patogênese da histoplasmose. Para o sucesso da infecção é necessária a alteração da morfologia de *H. capsulatum* de micélio para levedura já que, apesar da forma miceliana ser infecciosa, é a forma leveduriforme que sobrevive intracelularmente causando doença (NEMECEK; WUTHRICH; KLEIN, 2006).

Genes envolvidos no controle da transição dimórfica e expressão de fatores de virulência foram descritos e demonstraram evidências da existência de um controle da morfogênese e patogenicidade (HOLBROOK; RAPPEYE, 2008). No entanto, um número limitado de estudos tem focado eventos

moleculares ocorridos no dimorfismo de *H. capsulatum*, uma vez que a espectrometria de massas, embora uma ferramenta poderosa no estudo do proteoma de patógenos intracelulares, teve aplicação limitada no sistema *Histoplasma*.

Partindo da premissa de que um importante componente do potencial patogênico de *H. capsulatum* seja o dimorfismo, o estudo de proteínas com abundância diferencial nas distintas morfologias do fungo seria importante, permitindo esclarecer com maior precisão diferenças metabólicas entre a fase miceliana e a fase leveduriforme, essencial para o estabelecimento doença. Desta forma, acreditamos que os dados oriundos deste trabalho, avaliando uma cepa de referência utilizada por diversos grupos de pesquisa, poderão contribuir para um melhor entendimento dos processos envolvidos na biologia de *H. capsulatum* e estabelecer parâmetros para estudos futuros.

Outrossim, os estudos de identificação das proteínas expressas na fase parasitária deste fungo podem: (i) identificar marcadores biológicos que poderiam ser aplicados em métodos diagnósticos de maior acurácia, auxiliando no reconhecimento precoce da infecção e no acompanhamento do tratamento; (ii) possibilitar a descoberta de antígenos para possível inclusão em uma vacina candidata à prevenção da histoplasmose; (iii) levar ao conhecimento futuro de importantes alvos terapêuticos, uma vez que são poucos os medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento desta infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Para um melhor entendimento dos processos metabólicos abrangidos na diferenciação celular de *H. capsulatum*, o intuito deste estudo é identificar proteínas diferencialmente abundantes nas formas de micélio e levedura de *H. capsulatum*, bem como caracterizar potenciais alvos candidatos ao desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais acurados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Caracterizar os perfis proteômicos nas fases miceliana e leveduriforme de *H. capsulatum*;
- B. Descrever vias metabólicas preferencialmente utilizadas pelo fungo nas formas de micélio e levedura;
- C. Identificar possíveis proteínas antigênicas da fase leveduriforme de *H. capsulatum* para serem aplicadas ao imunodiagnóstico da histoplasmose;
- D. Avaliar o método de coimunoprecipitação na predição de alvos antigênicos específicos de *H. capsulatum* na fase leveduriforme;
- E. Caracterizar e avaliar o papel funcional preditivo de um potencial antígeno de *H. capsulatum*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLADO, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DO FUNGO

Histoplasma capsulatum, isolado G-217B (ATCC 26032) foi utilizado em todos os experimentos citados nesse estudo, crescido em meio Nutriente Mixture F12 Ham (GIBCO, Life technologies, Grand Island, NY) suplementado com glicose (18,2 g/L), ácido glutâmico (1 g/L), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES [6 g/L]), e cisteína (8,4 mg/L), pH 7,5. A fase leveduriforme do fungo foi crescida a 36°C por 72h e a fase miceliana a 25°C por 96h. Ambas as situações foram inoculadas em meio Nutriente Mixture F12 Ham e incubados sob agitação constante de 150rpm. As duas etapas foram acompanhadas ao microscópio óptico comum Zeiss®, modelo Primo Star e as imagens foram obtidas utilizando o software AxioVision (Rel 4.8).

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS PROTEICOS

As células foram coletadas por centrifugação (10.000g, 10min, 4°C), lavadas por três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 e congeladas a -80°C até o processamento. Os extratos proteicos foram obtidos por maceração mecânica na presença de nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo até a completa pulverização celular. Posteriormente foi adicionado tampão de extração (20mM Tris-HCl pH8,8, 2mM CaCl₂) suplementado com inibidores de proteases (serina e cisteína) sem EDTA (cOmplete Mini®, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), e esferas de zircônia (0,5mm). O material foi submetido à agitação vigorosa em Mini-Beadbeater (Biospec products) em cinco ciclos de 30 segundos, intercalado com banho de gelo por um minuto. Após o rompimento celular, foi realizada centrifugação a 10.000g por 15min a 4°C e a concentração de cada extrato proteico foi determinada pelo método de Bradford,

utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976). O perfil qualitativo das proteínas obtidas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DE MICÉLIO E LEVEDURA DE *H. capsulatum*

4.3.1 Digestão trípica

A digestão enzimática das proteínas foi realizada de acordo com Murad e colaboradores (2011), com algumas modificações (BAEZA et al., 2017). Foram digeridos 150µg de extrato de proteínas totais, obtidas como descrito anteriormente no item 4.2 (Preparo dos extratos proteicos). Inicialmente, os extratos foram colocados em tubos tipo Eppendorf de 1,5mL e adicionados 75µL de RapiGEST™ SF Surfactante (0,2% v/v) (Waters, Milford, MA, USA), homogeneizados em vórtex e incubados em banho seco a 80°C por 15 minutos. Após este período, as pontes de dissulfeto foram reduzidas adicionando-se 2,5µL de Ditionitroto (100mM) (DTT) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) a 60°C por 30 minutos, posteriormente, foi realizada alquilação das cisteínas pela adição de 2,5µL de Iodoacetamida (300mM) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As proteínas foram digeridas pela adição de 30µL de tripsina (0.05 µg/µL) (Promega, Madison, WI, USA) a 37°C em banho seco por 16 horas. Para precipitar o RapiGEST™ e parar a ação da tripsina, foram adicionados 30µL de solução de ácido trifluoroacético a 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), com incubação por 90 minutos a 37°C, em seguida de centrifugação a 18.000g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante recuperado, foi transferido para um novo tubo e seco no equipamento Speed Vacuum (Eppendorf, Hamburg, Germany). Os peptídeos obtidos foram ressuspensos em 80µL de uma solução de formiato de amônio (20mM) - pH 10. Para permitir a quantificação dos peptídeos, PHB (Rabbit Phosphorylase B) (Waters Corporation) (MassPREP™ protein) foi adicionada

aos mesmos em uma concentração final de 150 fmol/ μ L, como padrão interno, e transferidos para microtubos (Waters Corporation, Manchester, UK).

4.3.2 Aquisição de dados por NanoUPLC-MS^E

Os peptídeos trípticos foram separados por cromatografia líquida de ultra performance em nano escala utilizando o sistema *nanoACQUITY™ system* (Waters Corporation, USA). A primeira dimensão da cromatografia foi realizada em uma pré-coluna de fase reversa *nanoEase™* 5 μ m x *Bridge™* BEH130 C18 300 μ m x 50mm (Waters, USA), que permitiu o fracionamento dos peptídeos. O sistema foi mantido em fluxo de 0,9 μ L/min com uma condição inicial de acetonitrila (ACN) de 3%. Os peptídeos foram fracionados cinco vezes (F1-F5) utilizando diferentes gradientes lineares de concentrações de ACN (F1-11,4%; F2-14,7%; F3-17,4%; F4-20,7% e F5-50%). A segunda dimensão foi realizada pela eluição de cada fração a partir da coluna de aprisionamento *Trap, 2D Symmetry®* 5 μ m BEH100 C18, 180 μ m x 20mm (Waters, USA) e separadas em uma coluna analítica BEH130 C18 1.7 μ m, 100 μ m x 100mm (Waters, USA). A coluna foi operada em fluxo de 2.000 μ L/min a 40°C. Para calibração de massa, foi utilizada a proteína *[Glu1]-Fibronopeptide B human* ($[M+2H]^{2+} = 785,8426$) na concentração 200 fmol/ μ L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sendo mensurada a cada 30 segundos, com fluxo constante de 0,5 μ L/min. O sistema de cromatografia 2D é acoplado a um espectrômetro de massas *Synapt G1 MS™* (Waters, USA) equipado com uma fonte de NanoElectronSpray e dois analisadores de massa, um quadrupolo e um tempo de voo (TOF - *Time of Flight*) operando em modo V, que permitiu a identificação e quantificação dos peptídeos. Os dados foram obtidos usando o instrumento em modo MS^E, que faz a troca entre energia baixa (6V) e energia alta (40V) em cada modo de aquisição 0,4s. As amostras foram analisadas em três replicatas biológicas e experimentais.

4.3.3 Processamento dos espectros e identificação de proteínas

Os dados obtidos a partir da análise de espectrometria de massas em *UPLC-MS^E* foram processados no programa *ProteinLynx Global Server* versão 2.4 (PLGS) (Waters, Manchester, UK). Após o processamento, cada íon demonstrou um tempo de retenção de massa exata, e massa molecular foi inferido com base na razão carga/massa (m/z). Em seguida, os espectros processados foram comparados com sequências de proteínas de *H. capsulatum* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) juntamente com sequências reversas. O erro de massa tolerável para identificação dos peptídeos foi de até 50 partes por milhão (ppm). Os critérios de identificação das proteínas incluíram: (i) detecção de no mínimo dois íons fragmentos de peptídeos, (ii) cinco por fragmentos de proteínas, (iii) determinação de pelo menos um peptídeo por proteína, (iv) taxa de detecção de falso positivo de no máximo 4%, (v) carbamidometilação da cisteína, (vi) oxidação da metionina, (vii) fosforilação da serina, treonina e tirosina, (viii) e um sítio de clivagem perdida pela tripsina foi permitido. A taxa mínima de repetição para cada proteína em todas as replicatas foi de 2.

Para a análise da diferença de abundância proteica entre as amostras de micélio e levedura, primeiramente foi feita a normalização de intensidade com a proteína que apresentou menor coeficiente de variância e que foi detectada em todas as réplicas. Em seguida os resultados foram processados, usando o modelo matemático de Algoritmo de Expressão (Expression^E), que faz parte do *software* PLGS (GEROMANOS et al., 2009). As proteínas que apresentaram diferenças de 50% nos valores de abundância em relação ao controle foram consideradas diferencialmente abundantes. Os resultados foram demonstrados em tabelas e mapas de calor, gerados pelo programa *Microsoft Office Excel* (Microsoft®, USA) e *software* MultiExperiment Viewer V.4.8 (www.tm4.org/mev/), respectivamente.

Gráficos de qualidade dos dados proteômicos (faixa de detecção dinâmica das proteínas, tipo de fragmentação dos peptídeos e precisão de identificação de massa dos peptídeos) foram gerados pelos os programas *MassPivot v1.0.1*

(gentilmente cedido pelo Dr André Murad), *FBAT software* (LAIRD et al., 2000) e *Spotfire® v8.0* (TIBCO Software Inc.®).

As proteínas identificadas foram classificadas em categorias funcionais de acordo com o MIPS (*Functional Catalogue Database*) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funecatDB/>), utilizando bancos de dados disponíveis *on-line*, como, Pedant (<http://pedant.gsf.de/>), Uniprot (<http://www.uniprot.org>) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Proteínas hipotéticas e conservadas foram submetidas a ferramenta *Blastp* (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI para busca de similaridade de sequências.

4.3.4 Ensaio de quantificação de etanol

As concentrações de etanol foram determinadas usando um kit de detecção enzimática de acordo com as instruções do fabricante (UV-test for ethanol, RBiopharm, Darmstadt, Alemanha).

O etanol é oxidado em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). O acetaldeído foi quantitativamente oxidado a ácido acético na presença de aldeído desidrogenase, liberando NADH, cuja quantidade foi determinada medindo a absorvância a 340nm. As células de levedura e fase miceliana de *H. capsulatum* foram cultivadas em meio Hams F12 por 72h (36°C) e 96h (25°C), respectivamente. Neste ensaio foram utilizados 0,5g de células de cada uma das duas condições, lisadas com auxílio de esferas de vidro e submetidas à agitação vigorosa em Mini-Beadbeater (BioSpec, Oklahoma, USA) por 5 ciclos de 30s, em intervalos de 1min em banho de gelo. O lisado celular foi centrifugado a 10.000g por 15min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de etanol foram obtidas em triplicata. O teste t de Student foi realizado e $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.3.5 Atividade da isocitrato liase (ICL)

As extrações proteicas de células de levedura e micélio de *H. capsulatum* e a dosagem de proteínas foram realizadas conforme mencionado anteriormente. Neste ensaio, uma quantidade de 50µg de proteína foi utilizada. A atividade da ICL foi determinada medindo a formação de glioxilato como o seu derivado de fenil-hidrazona segundo metodologia previamente descrita (Ebel et al., 2006). A formação do produto foi acompanhada medindo a absorvância a 324nm, utilizando um coeficiente de extinção de 16,8 mM⁻¹ cm⁻¹ em uma mistura reacional contendo 2mM de treo-D,L-isocitrato (Sigma Aldrich), 2mM MgCl₂, 10mM fenil-hidrazina HCl (Sigma Aldrich), 2mM de DTT e 50mM de fosfato de potássio (pH 7,0). A atividade específica foi determinada como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de glioxilato-fenilidrazona por min/por mg de proteína total. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student e $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.3.6 Dosagem da metilcitrato-sintase (MCS)

Após a extração de proteínas, os extratos foram utilizados para determinar a atividade da MCS. O método utilizado, conforme descrito anteriormente (BROCK et al., 2004), baseou-se na formação de nitrotiofenolato (2-mercapto-5-nitrobenzoato dianion) durante a reação de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) com coenzima A, liberado durante a condensação do oxaloacetato com propionil-CoA. Uma curva padrão de DTT foi usada como controle porque exerce uma função análoga ao grupo coenzima A durante a reação com DTNB. A curva foi realizada variando a concentração de 1mM a 25mM de DTT, contendo concentração fixa de 1mM de DTNB. Posteriormente, três pontos da curva foram selecionados para determinar a equação da reta. Para o ensaio, foram utilizados 5µg de extrato de proteína bruta; DTNB 1mM; Propionil-CoA 0,2mM; e o volume final da reação ajustado para 150µL com Tris-HCl pH 8,0 a 50mM. O ensaio foi iniciado pela adição de 1mM de oxaloacetato e monitorado por absorvância a 412nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a liberação de 1µmol de

coenzima A por miligrama de proteína por minuto por mililitro. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student e $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

4.3.7 Microscopia de fluorescência

O perfil de ligação das lectinas à parede celular de *H. capsulatum* foi avaliado por microscopia de fluorescência, na qual as células foram marcadas por Con A (concanavalina A), WGA (aglutinina do germe de trigo) e Dectina-1-Fc. O corante fluorescente Uvitex 2B foi usado para se ligar à quitina na parede das células fúngicas.

Após o cultivo de células de levedura e micélio de *H. capsulatum* em meio Hams F12 por 72h (36°C) e 96h (25°C), respectivamente, as células foram coletadas por centrifugação (10.000g, 10 min, 4°C) e lavadas por três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4. Então, 10^6 células foram fixadas com paraformaldeído (4%) *overnight* a -20°C. Depois disso, as células foram bloqueadas em PBS contendo 1% de BSA durante 1h à temperatura ambiente. O próximo passo seguiu em dois diferentes sistemas: (i) as células foram incubadas com Con A na concentração final de 100µg/mL e WGA na concentração final de 1µg/mL por 1h, sob agitação e no escuro; (ii) as células foram incubadas com Dectina-1-Fc na concentração final de 5µg/mL também por 1h, sob agitação e no escuro, seguido por incubação com 2µg/mL de anticorpo policlonal de cabra anti- IgG de camundongo (Alexa 488) durante 1h. A quitina na parede celular foi marcada utilizando uma solução de 5mg/mL de Uvitex 2B em PBS incubada com as células durante 15min, sob agitação. Entre as incubações, as células foram lavadas 3 vezes com PBS. As amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.), com uma ampliação de 100X, e as imagens analisadas pelos Softwares Image J (NIH, Bethesda) e Adobe Photoshop C5S (Adobe Systems Software).

4.3.8 Análise por *Western blot*

Extratos proteicos de células de levedura e micélio de *H. capsulatum* (10µg) foram analisados por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em 12% de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970).

Após o término da corrida eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,2µm (Bio-Rad) utilizando sistema *Semidry* (TE 77 PWR, Amersham Biosciences). A transferência foi realizada a 80mA/gel por 1h e 30min em tampão de transferência (Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%) e logo em seguida a membrana foi corada com Ponceau (Ponceau 0,2% e Ácido acético 2%), para verificação da eficiência da transferência, e então lavada com PBS-T pH 7,2 (KH₂PO₄ 1,4 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Tween 20 a 0,2%).

As membranas foram bloqueadas à temperatura ambiente durante 1h, sob agitação constante em PBS-T contendo 5% (p/v) de leite desnatado [PBS-TL]. Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão PBS-T por três vezes durante 5min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal anti-HSP30 (massa molecular do antígeno igual a 27,6 kDa); anticorpo monoclonal anti-HSP60 (massa molecular do antígeno igual a 61,8 kDa) e anticorpo monoclonal anti-catalase B (massa molecular do antígeno de aproximadamente 85,0 kDa). Anticorpo monoclonal específico para a β-tubulina (massa molecular do antígeno igual a 58,0 kDa) foi utilizado como controle. Esta etapa foi seguida por três lavagens de 5min em tampão PBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado apropriado, quer anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado com peroxidase, a uma razão de 1 para 5.000 (v/v). Finalmente, as membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit SuperSignal® West Dura Chemiluminescent Substrate (Pierce, Illinois, USA) de acordo com as informações do fabricante. O luminol diluído foi incubado com a membrana durante 3min. Após a exposição, a membrana foi colocada em contato com o filme High Performance Chemiluminescence (GE Healthcare, USA) por até 2min. O filme foi revelado em solução de revelação (Revelador GBX [Kodak, USA]),

lavado em água destilada e solução de fixação (Fixador GBX [Kodak, USA]), por 1min em cada etapa.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ANTÍGENOS POR ANÁLISES PROTEÔMICAS

4.4.1 Coimunoprecipitação de proteínas

A primeira etapa empregada na identificação de potenciais antígenos de *H. capsulatum* foi a coimunoprecipitação, na qual foram utilizadas microesferas magnéticas - Dynabeads® Protein G (Invitrogen, California, USA) seguindo protocolo descrito por Moura e colaboradores (2011).

Na etapa de ligação do anticorpo, 50µL da solução contendo as microesferas foram ressuspensas e transferidas para um novo tubo e em seguida separadas em plataforma magnética por 5min e o sobrenadante foi removido. As microesferas foram lavadas por três vezes (5min) em 200µL de PBS com Tween 20 (PBS-T). Foram adicionados 10µg de cada *pool* de soros de três situações distintas: a) 10 soros de pacientes com histoplasmose comprovada pelo isolamento de *H. capsulatum* em cultura (diferentes formas clínicas); b) 10 soros de pacientes com outras micoses (paracoccidiodomicose, coccidiodomicose, aspergilose e criptococose) e tuberculose; c) 10 soros de indivíduos saudáveis. Como controle, as microesferas foram incubadas apenas com 200µL de PBS. Para cada situação foi realizada a triplicata experimental. Os soros foram diluídos em 200µL de PBS e incubado por 2h à temperatura ambiente sob rotação. Novamente, as microesferas foram separadas em plataforma magnética por 5min e o sobrenadante foi removido. As microesferas foram lavadas por três vezes (5min) em 200µL de PBS-T.

Para a etapa de *crosslinking* foram adicionados 200µL de solução DMP (dimethyl pimelimidate) 13mg/mL em PBS (pH 9,0) por 15min sob rotação a temperatura ambiente. Mais uma vez as microesferas foram separadas em plataforma magnética por 5min e o sobrenadante removido, seguido de três lavagens (5min) em 200µL de PBS-T.

Na etapa de imunoprecipitação, foram adicionados 25µg do extrato proteico obtido da fase leveduriforme de *H. capsulatum*, avolumado para 200µL com PBS-T e submetido à rotação à temperatura ambiente por 2h. Mais uma vez, se realizou as etapas de separação das microesferas e lavagens.

Para a etapa da eluição, as microesferas foram ressuspensas em 100µL de PBS-T e transferidas para um novo tubo. Os peptídeos foram eluídos em 50µL de solução contendo 0,1M de glicina (pH 2,8) incubados por 5min à temperatura ambiente submetido a rotação. As microesferas foram separadas em plataforma magnética por 5min, o sobrenadante removido e o pH ajustado para 7,0. Posteriormente, as amostras foram secas em *Speed Vac* e estocadas a -20°C até a utilização.

4.4.2 Análise por espectrometria de massas

As proteínas obtidas pela técnica de coimunoprecipitação foram submetidas à etapa de digestão, na qual foram inicialmente ressuspensas em 20µL de solução contendo bicarbonato de amônio (0,4M) e uréia (8M) e adicionados 5µL de DTT (100mM). Foram então incubadas a 37°C por 30min. A seguir, foram adicionados 5µL de iodoacetamida (400mM) e incubado por 15min à temperatura ambiente, no escuro. Na etapa seguinte, foram adicionados 130µL de água milli-Q e tripsina (Promega, Wisconsin, USA) na proporção de 1/50 (m/m) de enzima para substrato, e incubado por 16h a 37°C. Em seguida, foi realizada uma incubação a 56°C por 45min. A reação então foi parada com 20µL de ácido fórmico a 10% (v/v).

Para a dessalinização, as amostras foram acidificadas para uma concentração final de 1% de TFA (ácido trifluoroacético) e aplicadas em micro coluna Poros R2. A micro coluna foi lavada duas vezes com solução de 100% de ACN (acetonitrila) e equilibrada com solução de 1% de TFA (quatro vezes). A amostra foi então aplicada na coluna e submetida a cinco lavagens com solução de 0,1% de TFA. A eluição foi realizada em 4 lavagens com solução de 0,1% de TFA em 70% de ACN e submetidas a etapa de secagem em *Speed Vac*.

Os peptídeos obtidos foram submetidos à nanocromatografia de fase-reversa acoplada à espectrometria de massa nano-electrospray de alta resolução. Um volume de 4 μ L foi aplicado em pré-coluna Magic C18 AQ, com 5 μ m, 200Å (2 cm de comprimento, 100 μ m de diâmetro; Michrom Bioresources, USA). Em seguida, os peptídeos foram separados numa coluna ReproSil C18 AQ, com 3 μ m, 200Å (20 cm de comprimento, 75 μ m diâmetro; PicoFrit, New Objective, USA). A cromatografia foi realizada no instrumento EASY-nLC II (Thermo Scientific, USA). As amostras foram aplicadas na pré-coluna a um fluxo de 2.000nL por minuto, enquanto que a separação ocorreu a fluxo de 200 nL por minuto. A fase móvel A consistiu 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água. A fase móvel B consistiu em 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila. As condições do gradiente de eluição dos peptídeos foram de 2 a 40% de B em 168 minutos.

Os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, USA). Para cada espectro, os sete íons mais intensos foram submetidos à fragmentação CID (Collision-induced dissociation) prontamente seguida de aquisição MS-MS no analisador linear trap.

4.4.3 Análise de dados

Os espectros de massa obtidos foram analisados utilizando o banco de dados de sequências proteicas do NCBI (National Center for Biotechnology information) usando Peaks Client 5.3 (Bioinformatics Solutions Inc.).

Os parâmetros de pesquisa para massas de peptídeos monoisotópicos permitiram duas clivagens enzimáticas perdidas e aceitaram oxidação da metionina e carbamidometilação da cisteína como modificações variável e fixa, respectivamente. A tolerância de massa para os peptídeos foi de 10 ppm para os íons precursores e 0,6Da para os íons-fragmento.

Após identificadas as proteínas, diagramas de Venn foram criados utilizando a ferramenta Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), de forma a reconhecer quais foram detectadas nas três replicatas experimentais de cada uma das condições. A partir da intercessão de proteínas reconhecidas pelo *pool* de soros de pacientes com histoplasrose (HPM) nas três replicatas, foi construindo um novo diagrama de Venn, com todas as proteínas reconhecidas

pelo *pool* de soros de pacientes com outras infecções (HET), *pool* de soros de indivíduos saudáveis (HÍG), e com todas as proteínas reconhecidas no experimento controle, ainda que reconhecidas em apenas uma das replicatas.

4.4.4 Análise *in silico* de antigenicidade

As sequências polipeptídicas identificadas a partir da técnica de coimunoprecipitação foram submetidas à ferramenta *Blastp* do NCBI para busca de similaridade de sequências.

Para análise de antigenicidade, as sequências de aminoácidos foram avaliadas utilizando o software DNASTar Protean 7.0 (DNASTAR Inc.), pelo algoritmo de Jameson-Wolf, associado ao índice de hidrofobicidade (Kyte-Doolittle) e a probabilidade de acessibilidade de superfície da proteína (Emini).

Paralelamente, a fim de complementar a análise de predição de epítomos B, as sequências de aminoácidos foram analisadas pelo servidor online de predição de epítomos, BCPREDS (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/index.html>). Nele, a sequência primária da proteína foi dada como entrada, e adicionalmente restringimos o servidor para realizar predição de epítopo de comprimento fixo de 20 aminoácidos. Também fornecemos 75% como especificidade e solicitamos ao servidor que relatasse apenas epítomos não sobrepostos.

4.4.5 Análise de reatividade frente ao antígeno M

De forma a confirmar a reatividade dos três *pools* de soros (indivíduos com histoplasmosse, indivíduos com outras infecções e indivíduos saudáveis) e de cada um dos soros que o compunham, frente ao antígeno M recombinante, foram realizados dois ensaios imunoenzimáticos: *Western blot* e ELISA indireto. Em ambos os ensaios foi utilizado o antígeno M recombinante, descrito por Zancopé-Oliveira e colaboradores (1999), com pequenas modificações propostas por Guimarães e colaboradores (2008).

4.4.5.1 ELISA indireto

No ELISA indireto, antígeno M recombinante foi adicionado (2µg/poço) a placas de 96 poços (Nunc-Immuno Starwell, MaxiSorp Surface) diluídos em 100µL de tampão carbonato (63mM) - pH 9,6 e incubados *overnight* a 37°C. As placas foram então lavadas por três vezes com 100µL de PBS-T, pH 7,2 (KH₂PO₄ 1,4 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Tween 20 a 0,2%) e bloqueadas com 100µL de PBS-T contendo 5% (p/v) de leite desnatado [PBS-TL] por 2h a 37°. As placas foram lavadas novamente por três vezes. As amostras de soro foram adicionadas a cada poço em uma diluição de 1:100 em 100µL de PBS-TL e incubadas por 2h a 37°. Após mais três lavagens, as placas foram incubadas com 100µL da solução de anti-imunoglobulina G humana conjugada com peroxidase (Jackson Immunoresearch) na diluição de 1:32.000 em PBS-TL por 1h a 37°. Após três lavagens subsequentes, a reação foi revelada com 100µL por poço de dihidroclorato de o-fenilenodiamina (OPD; 0,4mg/mL em H₂O₂ 0,04%) diluído em tampão citrato de sódio 0,01M, pH 5,5. A reação então foi interrompida pela adição de 50µL de HCl 3M. As densidades ópticas (DOs) foram determinadas no espectrofotômetro (SPECTRA max PLUS - Molecular Devices) numa absorvância de 490nm. O ponto de corte (*cut-off*) para a reatividade dos soros foi determinado utilizando a média das DOs somada a três vezes o desvio padrão dos valores de log dos indivíduos saudáveis. As amostras de soros com valores de DOs acima do *cut-off* foram consideradas positivas.

4.4.5.2 Western blot

Antígeno M recombinante de *H. capsulatum* (0,25µg/mm) foi analisado por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em 12% de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970).

Após realizada a eletroforese, a proteína foi eletrotransferida para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,2µm (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA) e logo em seguida a membrana foi corada com Ponceau

(Ponceau 0,2% e Ácido acético 2%), para verificação da eficiência da transferência, e então lavada com TBS-T pH 8,0 (Tris 25 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Tween 20 a 0,2%). A técnica utilizada foi à mesma descrita por Pizzini e colaboradores (1999), empregando-se uma cuba de eletroforese (Mini-trans-blot cell, Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA).

A porção da membrana contendo o padrão de peso molecular foi separada do restante da membrana. A região que continha o antígeno M recombinante foi cortada em tiras de aproximadamente 5mm de largura, as quais foram utilizadas nas reações imunoenzimáticas.

Inicialmente, cada tira contendo o antígeno foi bloqueada por uma hora, à temperatura ambiente sob agitação constante, incubada em TBS-T contendo 5% de leite desnatado [TBS-TL], a fim de evitar possíveis ligações inespecíficas. Essas tiras foram então lavadas por três vezes com TBS-T, 5min para cada lavagem. Logo após, as amostras de soro foram diluídas (1:100) em TBS-TL e incubadas com as tiras por uma hora sob agitação constante. Posteriormente as tiras foram lavadas três vezes com TBS-T, 5min para cada lavagem. Em seguida, IgG de cabra anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch, EUA), na diluição de 1:3.000 em TBS-TL, foi aplicado sobre as tiras, e incubado por uma hora à temperatura ambiente sob agitação constante. Após outras três lavagens com TBS-T, por 5min cada lavagem, a reação foi revelada adicionando uma solução contendo 1 mL de BCIP (5-bromo 4-cloro 3- indolil-fosfato) e 1 mL de NBT (azul de nitro tetrazolium) para cada 100ml de tampão diluente do substrato (Tris HCl 0,1M pH 9,5 / 0,1M NaCl - 5mM MgCl₂ + 6 H₂O₂). Após observação das reações, as tiras foram lavadas exaustivamente com H₂O destilada para interromper a reação.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

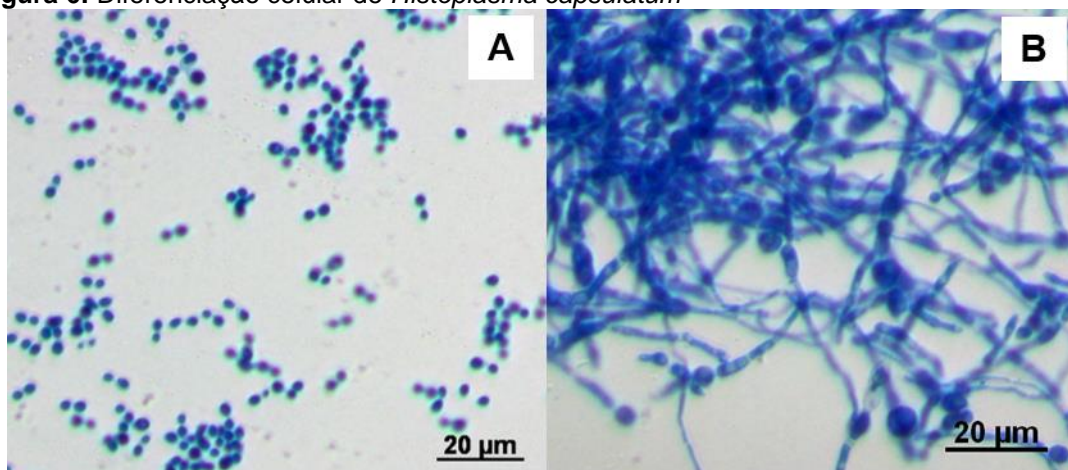
Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas e dispensado de apreciação ética pelo CEP, devido à natureza do estudo.

5 RESULTADOS

5.1 DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE *Histoplasma capsulatum*

Para avaliar a diferenciação celular de *H. capsulatum* foram testadas tanto a diferenciação de micélio para levedura como a de levedura para micélio. Foi observado que a diferenciação levedura-micélio se inicia por volta de 24h após a mudança de temperatura, onde já pode ser observada a formação de tubo germinativo. Após 48h foi observado que a maior parte das células já se encontrava em processo de diferenciação. Foi avaliado ainda o processo de diferenciação após 72 e 96h, momento onde foi possível observar praticamente 100% das células já diferenciadas para a forma de micélio. Desta forma, utilizamos neste estudo os pontos de crescimento gerados nos tempos zero (L) e 96h (M), demonstrados na Figura 6. A transição de micélio para levedura não apresentou resultados satisfatórios nas condições laboratoriais estudadas, uma vez que, mesmo após 96h de incubação do fungo a 37°C, o mesmo ainda se encontrava na forma filamentosa.

Figura 6: Diferenciação celular de *Histoplasma capsulatum*



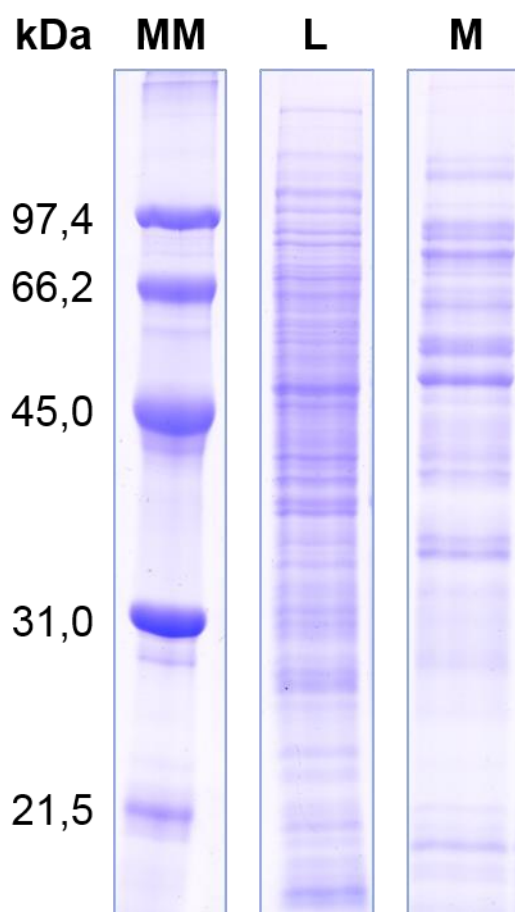
(A) Cultivo da fase leveduriforme por 72h a 37°C. (B) Cultivo da fase miceliana por 96h a 25°C. Coloração por lactofenol azul de algodão. Aumento de 400X.

5.2 EXTRATOS PROTEICOS

Os extratos proteicos foram obtidos com sucesso das duas condições, levedura e micélio, cultivados respectivamente a 72h a 37°C e 96h a 25°C. Os mesmos foram quantificados pelo método de Bradford, apresentando as concentrações de 9,2µg/µL e 14,6 µg/µL para levedura e micélio, respectivamente.

Os perfis dos extratos proteicos (20µg) foram resolvidos por SDS-PAGE e avaliados qualitativamente, revelando um perfil de bandas mais complexo no extrato obtido da fase leveduriforme que da fase miceliana (Figura 7).

Figura 7: Análise dos extratos proteicos de *Histoplasma capsulatum*



SDS-PAGE (12% de acrilamida) em coloração por azul de Coomassie. MM - Massa Molecular; L - Levedura; M - Micélio. Números à esquerda correspondem ao padrão de massa molecular.

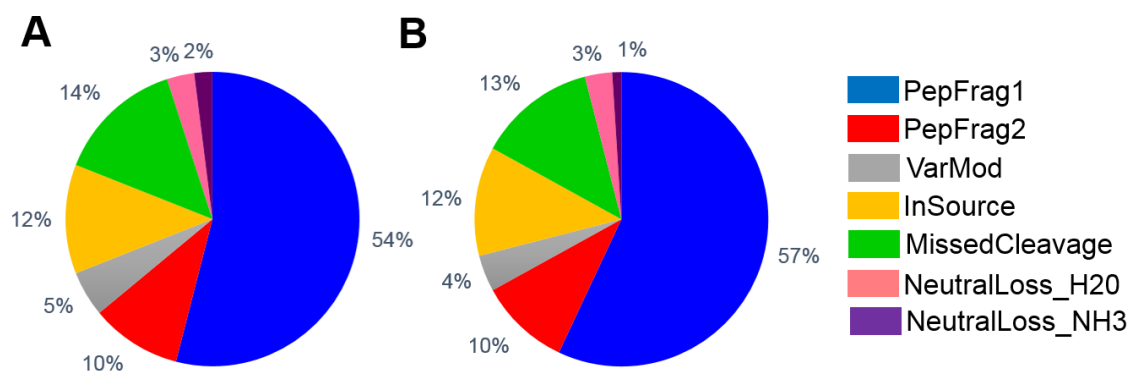
5.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DE NANO UPLC-MS^E

Os resultados da expressão de proteínas e peptídeos por nanoUPLC-MS^E e os dados gerados pelo software ProteinLynx Global Server versão 2.4 (Waters, Manchester, Reino Unido) são mostrados nas Figuras 8, 9 e 10.

Como resultado de duas fragmentações, foram obtidos 54% e 57% dos peptídeos em levedura e micélio, respectivamente no primeiro passo e 10% do segundo passo em ambos. Um total de 14 e 13% do total de peptídeos foi identificado pela clivagem perdida de tripsina nas respectivas condições, ao passo que a taxa de fragmentação que ocorreu na fonte de ionização foi de 12% para as duas condições (Figura 8). As taxas de falso positivos foram de 1,12% e 0,77%, em levedura e micélio, respectivamente.

Os dados mostram-se de boa qualidade, visto que a identificação pelo PepFrag 1 e 2 correspondem a mais de 50%, enquanto os dados de fragmentação na fonte e de clivagens perdidas não ultrapassaram 20% cada.

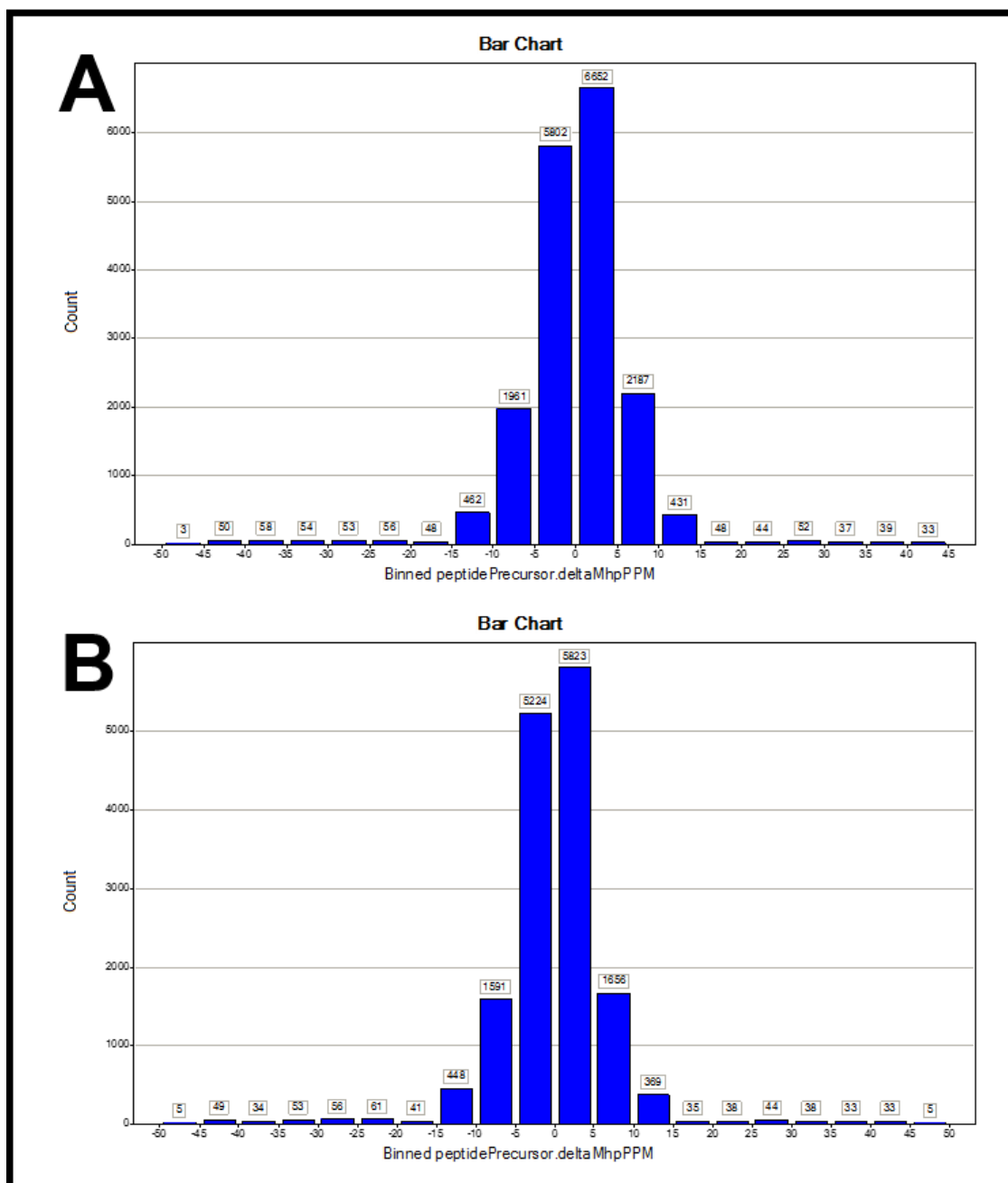
Figura 8. Qualidade dos peptídeos dos extratos proteicos



A - Levedura; B - Micélio. PepFrag1 e PepFrag2 - percentual de peptídeos comparado com o banco de dados de *Histoplasma capsulatum* no ProteinLynx Global Server versão 2.4; VarMod - modificações variáveis; InSource - fragmentação ocorrida na fonte de ionização; MissedCleavage - clivagem perdida realizada pela tripsina; NeutralLoss_H2O e NeutralLoss_NH3 correspondem as perdas de água e amônia, respectivamente.

A análise da precisão na detecção de massas também foi determinada, demonstrando que a grande maioria (mais de 90%) dos peptídeos gerados por ambas as amostras foram detectados com erro menor que 10 ppm (Figura 9).

Figura 9. Análise de acurácia na detecção de massa

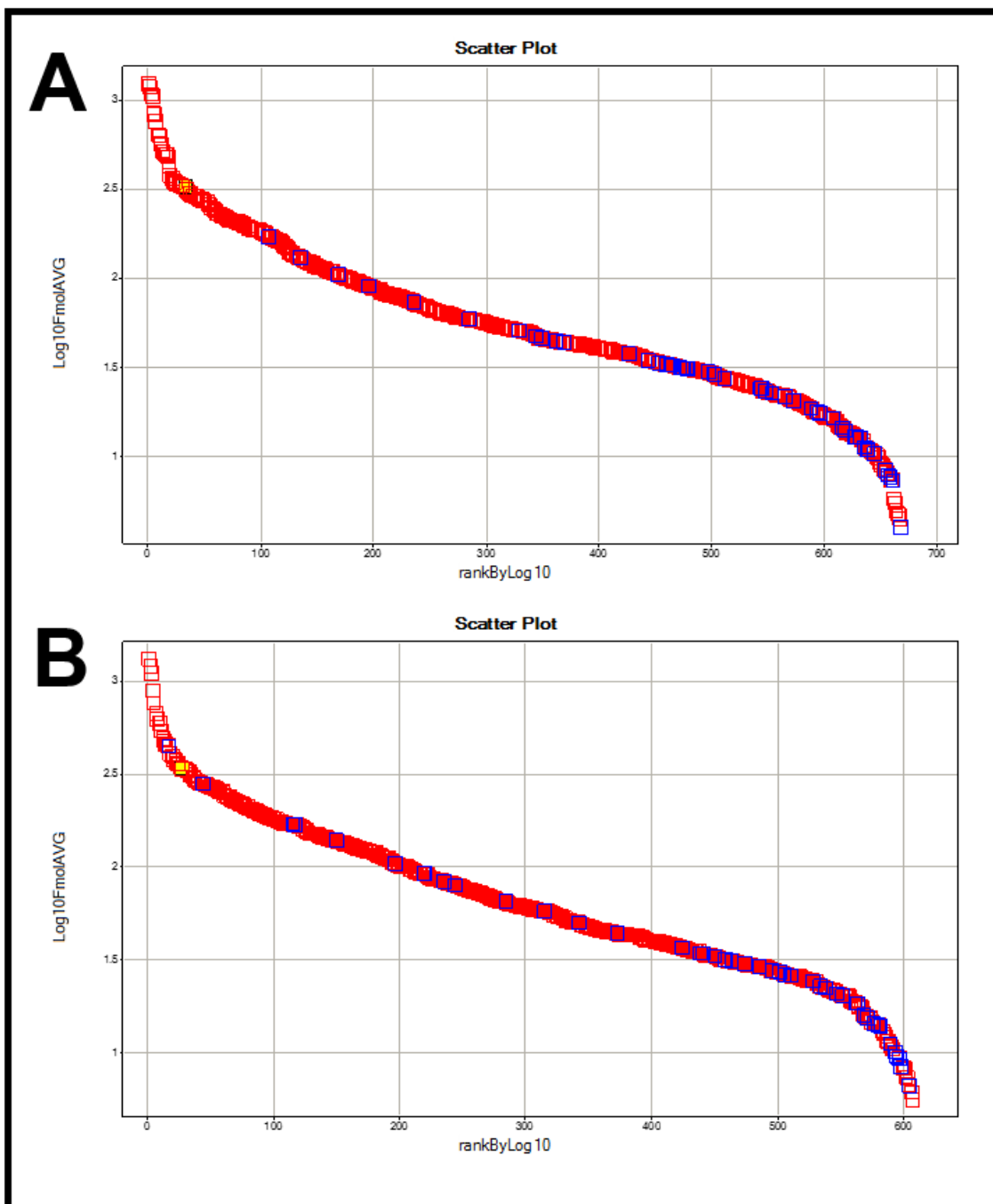


Os gráficos mostram acurácia na detecção das massas dos peptídeos em partes por milhão (ppm). Um total de 91,8% e 91,4% de peptídeos identificados foram detectados com erro menor que 10 ppm nos extratos de levedura (A) e micélio (B).

O gráfico de detecção dinâmica (Figura 10), mostra a abundância de cada proteína, indicando que a distribuição de detecção alcançou três ordens de magnitude, detectando proteínas com altos e baixos níveis de abundância. Os dados mostram uma faixa de detecção dinâmica aceitável para ambas as amostras, pois a curva se encontra no padrão sigmoide e o padrão endógeno - fosforilase B de coelho (PHB), uma proteína de concentração conhecida

adicionada à amostra utilizada para determinar a concentração das outras proteínas identificadas está dentro da curva, apresentando-se de forma similar nas duas amostras.

Figura 10. Gráfico representativo da faixa de detecção dinâmica das proteínas de acordo com sua abundância e massa molecular.



Gráficos para levedura (A) e micélio (B) foram gerados, apresentando proteínas identificadas de forma regular (vermelho), reversa (azul) e PHB (amarelo).

5.4 PROTEOMA DAS DIFERENTES FASES BIOLÓGICAS DE *H. capsulatum*

Um total de 696 proteínas foi identificado em levedura, sendo 440 identificadas em duas ou três réplicas (Apêndice A). Na condição de micélio, 623 proteínas foram identificadas, com 388 em duas ou três réplicas (Apêndice B).

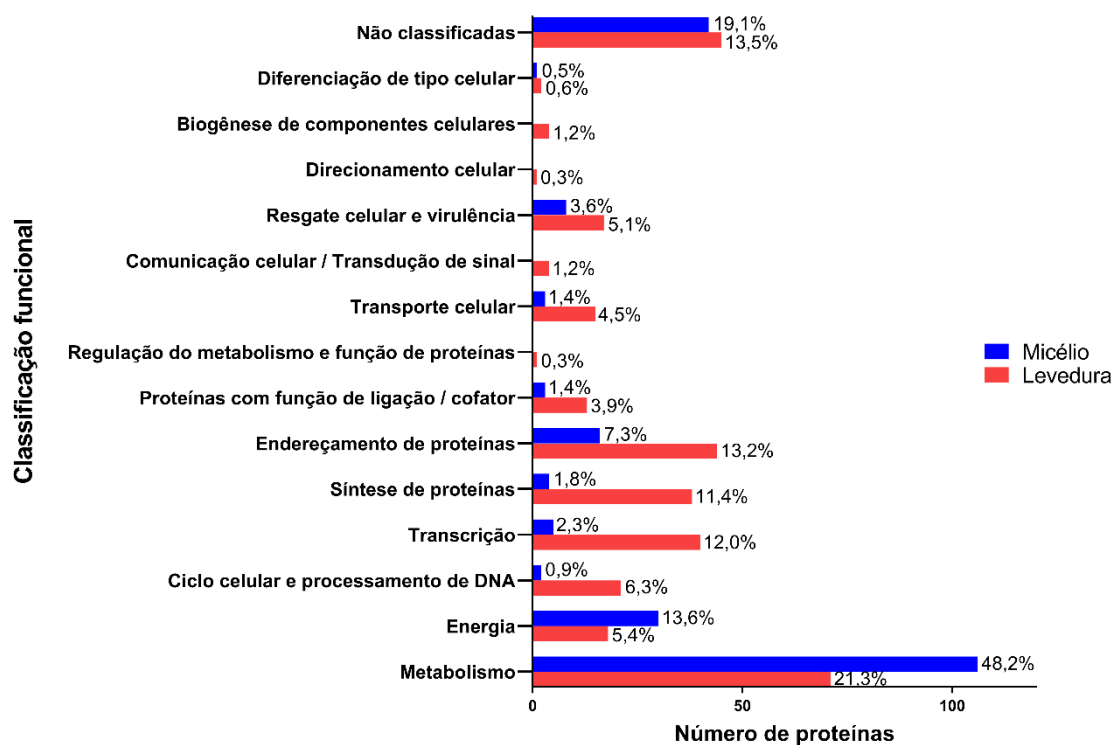
5.4.1 Características das proteínas nas formas miceliana e leveduriforme de *H. capsulatum*

Um nível de acúmulo de 50% (BAEZA et al., 2017) foi usado como limite para determinar as proteínas diferencialmente abundantes nas formas leveduriforme e miceliana do fungo. Essas proteínas foram classificadas e agrupadas de acordo com as categorias funcionais no *Functional Catalogue* (FunCat2), acessado no banco de dados MIPS (<http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis>). As proteínas preferencialmente abundantes em levedura e micélio, de acordo com sua classificação funcional, estão descritas nos apêndices C e D, respectivamente.

As proteínas classificadas como relacionadas ao metabolismo são as mais abundantes nas condições de levedura (21,3%) e micélio (48,2%). Logo em seguida, endereçamento de proteínas (13,2%), transcrição (12,0%) e síntese de proteínas (11,4%) são as mais abundantes na fase leveduriforme. Já na fase miceliana, as categorias mais abundantes de proteínas depois das relacionadas ao metabolismo, são obtenção de energia (13,6%) e endereçamento de proteínas (7,3%). Algumas proteínas não foram classificadas devido à sua desconhecida função, representando menos de 20% das proteínas analisadas.

A classificação funcional geral das proteínas preferencialmente abundantes em levedura e micélio é demonstrada na Figura 11.

Figura 11. Classificação funcional das proteínas de *Histoplasma capsulatum* identificadas com preferencial abundância nas formas de micélio e levedura



5.4.1.1 Metabolismo de *H. capsulatum*

5.4.1.1.1 Glicólise e fermentação

A Tabela 1 demonstra os níveis de abundância das enzimas relacionadas às vias metabólicas da glicólise e fermentação nas formas de micélio e levedura de *H. capsulatum*.

Tabela 1: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum* associadas à glicólise e fermentação

Número de acesso^a	Descrição da proteína^b	Score	Relação Micélio/Levedura^c
HCAG_08561	Alcohol dehydrogenase	11737,45	0,367879441
HCAG_05959	Alcohol dehydrogenase	566,41	*
HCAG_00576	Alcohol dehydrogenase	422,79	*
HCAG_01578	Alcohol dehydrogenase	1014,47	*
HCAG_02317	Alcohol dehydrogenase	1841,2	*
HCAG_05083	Alcohol dehydrogenase	573,72	*
HCAG_06397	Alcohol dehydrogenase	3336,29	*
HCAG_08789	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	487,44	*
HCAG_08202	Glucose-6-phosphate isomerase	3345,96	1,584073998
HCAG_08447	Glycogen phosphorylase	443,75	*
HCAG_03661	Hexokinase	998,21	*
HCAG_07781	Pyruvate kinase	3453,42	1,616074385

^a Identificação de proteínas diferencialmente abundantes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, UK).

^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

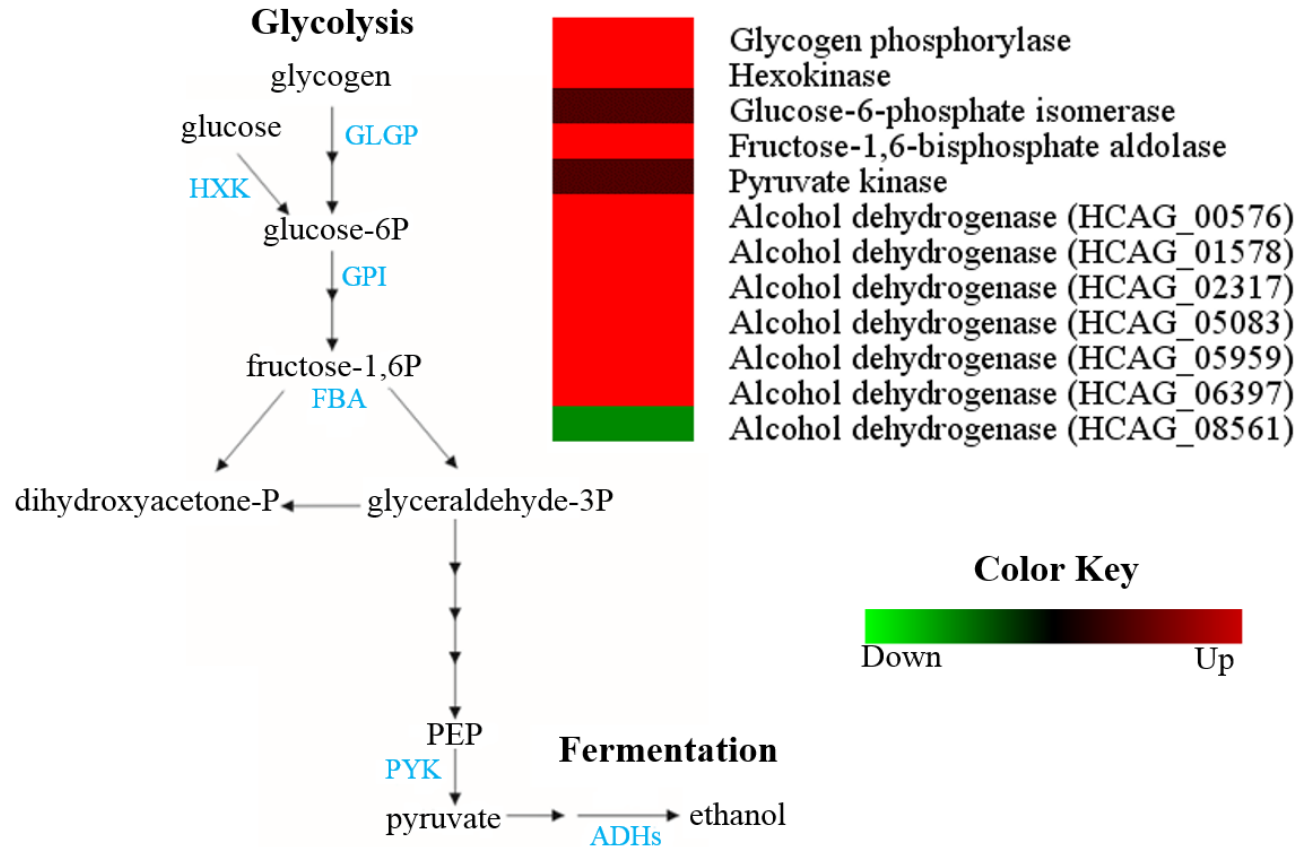
^c Relação micélio/levedura: Nível de abundância em micélio dividido pelo nível em levedura.

* Proteína identificada exclusivamente em micélio.

Como demonstrado no mapa de calor da Figura 12, glicogênio fosforilase (HCAG_08447), hexoquinase (HCAG_03661) e frutose-1,6-bifosfato aldolase (HCAG_08789) foram identificadas exclusivamente em micélio, e glicose-6-fosfato isomerase (HCAG_08202) e piruvato quinase (HCAG_07781) foram preferencialmente abundantes em micélio.

As enzimas álcool desidrogenases envolvidas na produção de etanol, foram observadas nas duas fases morfológicas. Entretanto, foram mais abundantes em micélio, no qual seis enzimas foram identificadas exclusivamente (HCAG_00576; HCAG_01578; HCAG_02317; HCAG_05083; HCAG_05959; HCAG_06397), contra somente uma preferencialmente abundante em levedura (HCAG_08561). Desta forma, presume-se que micélio produza etanol a partir de piruvato, como representado na Figura 12.

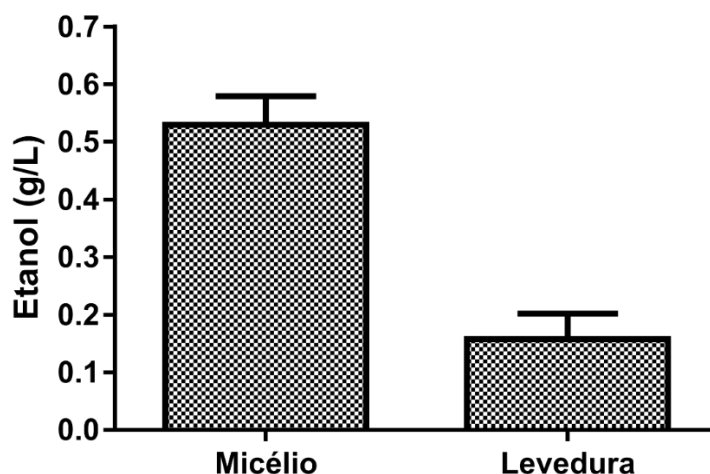
Figura 12. Comparação de perfis proteicos relacionados à glicólise e fermentação em *Histoplasma capsulatum*



Análise de variância foi aplicada para comparar os valores de abundância entre micélio e levedura, aplicando um ponto de corte de 1,5 vezes. Os dados de abundância foram obtidos utilizando o software Multi Experiment Viewer V.4.9, que foi usado para agrupar e comparar dados de abundância. O diagrama representativo das vias metabólicas da glicólise e fermentação representam proteínas diferencialmente abundantes (azul) nas fases de micélio e levedura. As alterações nos níveis de abundância em micélio em comparação com levedura das enzimas desta via são representadas em formato de mapa de calor. Os valores médios de triplicatas experimentais são apresentados para menor abundância (verde) e para maior abundância (vermelha) de proteínas de *H. capsulatum*.

A dosagem de etanol em células leveduriformes e micélio de *H. capsulatum* revelou que uma maior concentração de etanol foi produzida em micélio quando comparado à encontrada em células leveduriformes ($p= 0,0006$), confirmando os dados da análise proteômica (Figura 13).

Figura 13. Dosagem de etanol em micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum*



A concentração de etanol (g/L) foi determinada em células de micélio e levedura de *H. capsulatum*. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de triplicatas experimentais independentes. Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as duas condições com valor de $p < 0,05$.

5.4.1.1.2 Via das pentoses fosfato e resposta ao estresse

De forma a avaliar as proteínas relacionadas à via das pentoses fosfato e à resposta ao estresse nas condições de levedura e micélio de *H. capsulatum*, os níveis de abundância das proteínas listadas na Tabela 2 foram comparados.

Tabela 2: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum* associadas à via das pentoses-fosfato e resposta ao estresse

Número de acesso^a	Descrição da proteína^b	Score	Relação Micélio/Levedura^c
HCAG_05884	6-phosphogluconate dehydrogenase	8396,72	1,733253039
HCAG_04762	6-phosphogluconolactonase	715,43	*
HCAG_11461	Benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450	522,17	*
HCAG_08064	Catalase B	3577,16	1,840431425
HCAG_05109	Catalase isozyme A	540,66	*
HCAG_00642	Copper zinc superoxide dismutase	14672,71	*
HCAG_07098	Cytochrome c peroxidase	2459,3	0,379083027
HCAG_08658	Cytochrome c peroxidase	468,25	**
HCAG_09319	Cytochrome c peroxidase	9386,29	0,472366553
HCAG_06177	Gamma glutamyltranspeptidase	482,4	*
HCAG_04329	Glucose 6 phosphate 1 dehydrogenase	657,31	*
HCAG_01006	Glutathione S transferase	1541,74	*
HCAG_05805	Heat shock 70 kda protein C precursor	7309,1	0,357006970
HCAG_01785	Heat shock protein	496,42	**
HCAG_04111	Heat shock protein 30	3722,74	**
HCAG_08176	Heat shock protein SSC1	16061,23	0,304221246
HCAG_04471	Heat shock protein STI1	6316,99	0,313486191
HCAG_04943	Hsp10 like protein	23411,41	0,097295754
HCAG_06961	Hsp60 like protein	44302,76	0,201896513
HCAG_01398	Hsp70 like protein	60301,22	0,371576687
HCAG_00783	Hsp88 like protein	8480,9	0,423162076
HCAG_02530	Hydroxyacylglutathione hydrolase	1245,04	*
HCAG_03646	Stress protein p66	605,15	**
HCAG_01543	Superoxide dismutase, mitochondrial precursor	465,38	*
HCAG_06210	Thiol specific antioxidant	23966,17	0,522045789

HCAG_07019	Thioredoxin reductase	419,02	**
------------	-----------------------	--------	----

^a Identificação de proteínas diferencialmente abundantes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, UK).

^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Relação micélio/levedura: Nível de abundância em micélio dividido pelo nível em levedura.

* Proteína identificada exclusivamente em micélio.

** Proteína identificada exclusivamente em levedura.

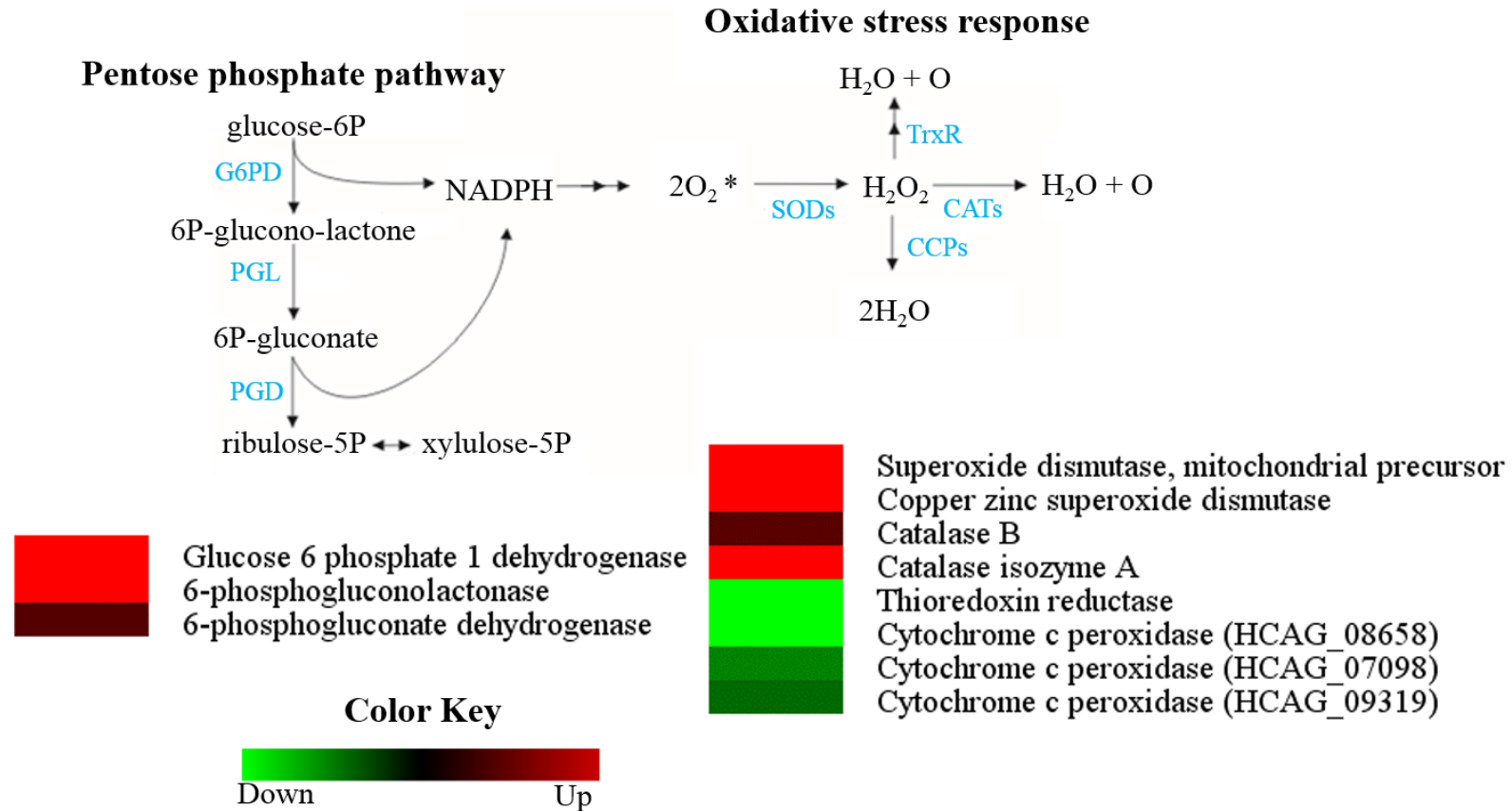
Os dados proteômicos obtidos em nosso estudo sugerem um aumento da via das pentoses fosfato na fase miceliana de *H. capsulatum*. As enzimas glicose-6-fosfato 1-desidrogenase (HCAG_04329), 6-fosfogluconolactona (HCAG_04762) e 6-fosfogluconato desidrogenase (HCAG_05884), foram mais abundantes nesta fase do ciclo biológico, indicando a oxidação de glicose-6-fosfato, levando à produção de NADPH (Figura 14).

Foram observadas várias proteínas e enzimas relacionadas à desintoxicação e resposta ao estresse oxidativo com abundância preferencial nas duas fases do ciclo biológico de *H. capsulatum*, como descrito na Figura 15.

Duas enzimas superóxido dismutases (SODs) foram identificadas exclusivamente no proteoma de micélio (HCAG_00642 e HCAG_01543), responsáveis pela dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em O_2 e H_2O_2 . Assim como a catalase A (HCAG_05109), também identificada apenas em micélio. Já a catalase B (HCAG_08064) foi identificada nas duas fases, com maior abundância em micélio. Essas proteínas catalisam a decomposição de H_2O_2 em oxigênio e água.

As enzimas citocromo C peroxidase (HCAG_07098; HCAG_08658; HCAG_09319) e tiorredoxina redutase (HCAG_07019) apresentaram maior abundância ou exclusividade na fase de levedura de *H. capsulatum* (Tabela 2).

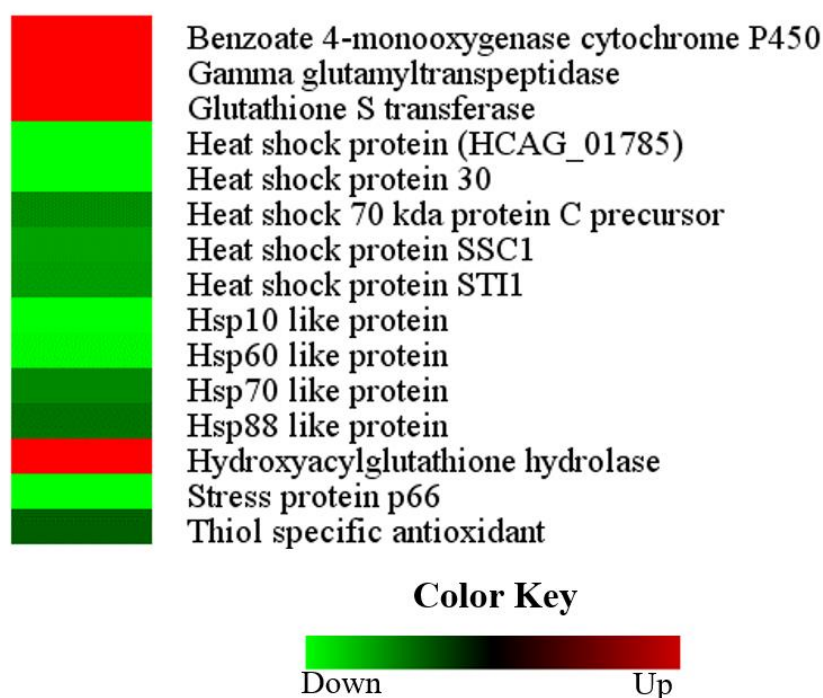
Figura 14. Comparação de perfis proteicos relacionados a via das pentoses-fosfato e estresse oxidativo em *Histoplasma capsulatum*



Análise de variância foi aplicada para comparar os valores de abundância entre micélio e levedura, aplicando um ponto de corte de 1,5 vezes. Os dados de abundância foram obtidos utilizando o software Multi Experiment Viewer V.4.9, que foi usado para agrupar e comparar dados de abundância. Diagrama representativo da via das pentoses-fosfato e dos mecanismos de desintoxicação contra as vias de estresse oxidativo que representam proteínas diferencialmente abundantes (azul) nas fases de micélio e levedura. As alterações nos níveis de abundância em micélio em comparação com levedura são representadas em formato de mapa de calor. Os valores médios de triplicatas experimentais são apresentados para menor abundância (verde) e para maior abundância (vermelha) de proteínas de *H. capsulatum*.

Outras proteínas relacionadas à resposta ao estresse com abundância diferencial em micélio e levedura de *H. capsulatum* são apresentadas na Figura 15, em formato de mapa de calor. Entre estas, se destacam nove proteínas de choque térmico (HCAG_00783, HCAG_01398, HCAG_01785, HCAG_04111, HCAG_04471, HCAG_04943, HCAG_05805, HCAG_06961, HCAG_08176) abundantes preferencialmente na forma leveduriforme (Tabela 2).

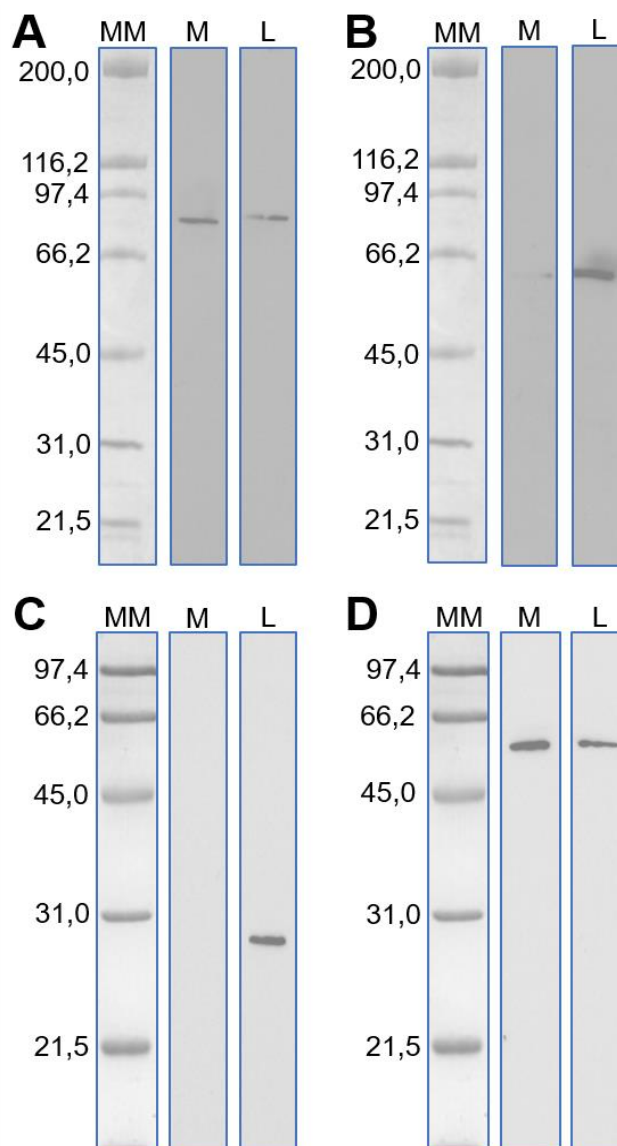
Figura 15. Comparação de perfis proteicos relacionados a resposta ao estresse em *Histoplasma capsulatum*



Análise de variância foi aplicada para comparar os valores de abundância entre micélio e levedura, aplicando um ponto de corte de 1,5 vezes. Os dados de abundância foram obtidos utilizando o software Multi Experiment Viewer V.4.9, que foi usado para agrupar e comparar dados de abundância. As alterações nos níveis de abundância em micélio em comparação com levedura são representadas em formato de mapa de calor. Os valores médios de triplicatas experimentais são apresentados para menor abundância (verde) e para maior abundância (vermelha) de proteínas de *H. capsulatum*.

Por meio da técnica de *Western blot*, a expressão da catalase B (HCAG_08064), da proteína de choque térmico de 60kDa (HCAG_06961) e da proteína de choque térmico de 30kDa (HCAG_04111) confirmam os dados encontrados na análise proteômica (Figura 16).

Figura 16. Análise de proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum* por Western blot



Extratos proteicos (10 μ g) de micélio (M) e levedura (L) de *Histoplasma capsulatum* após a reação com anticorpos monoclonais (*) e policlonais (**) contra as seguintes proteínas: A - Catalase B*; B - HSP60* (*heat shock protein* - 60kDa); C - HSP30** (*heat shock protein* - 30kDa); D - β -tubulina* (utilizada como controle). MM - Massa molecular.

5.4.1.1.3 Beta-oxidação e ciclos do glioxilato e do metilcitrato

Para avaliação da abundância de proteínas relacionadas à beta-oxidação e aos ciclos do glioxilato e do metilcitrato nas condições de levedura e micélio de *H. capsulatum*, foram comparados os níveis de abundância das enzimas listadas na Tabela 3 e demonstradas em forma de esquema na Figura 17.

Tabela 3: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum* associadas à beta-oxidação e aos ciclos do glioxilato e do metilcitrato

Número de acesso ^a	Descrição da proteína ^b	Score	Relação Micélio/Levedura ^c
HCAG_05094	2-methylcitrate dehydratase	9072,32	1,537257535
HCAG_05090	2-methylcitrate synthase	4778,23	2,585709628
HCAG_00780	Acetyl-CoA acyltransferase A	524,39	*
HCAG_05266	Aconitase	4771,98	1,616074385
HCAG_08510	Acyl-Coa dehydrogenase	2565,34	*
HCAG_09978	Acyl-Coa dehydrogenase	1447,54	1,599994191
HCAG_02218	Enoyl-Coa hydratase isomerase family protein	639,95	*
HCAG_10958	Isocitrate lyase	1771,38	2,857650982
HCAG_05084	Malate synthase	395,86	4,095955267
HCAG_05089	Methylisocitrate lyase	392,94	2,013752683

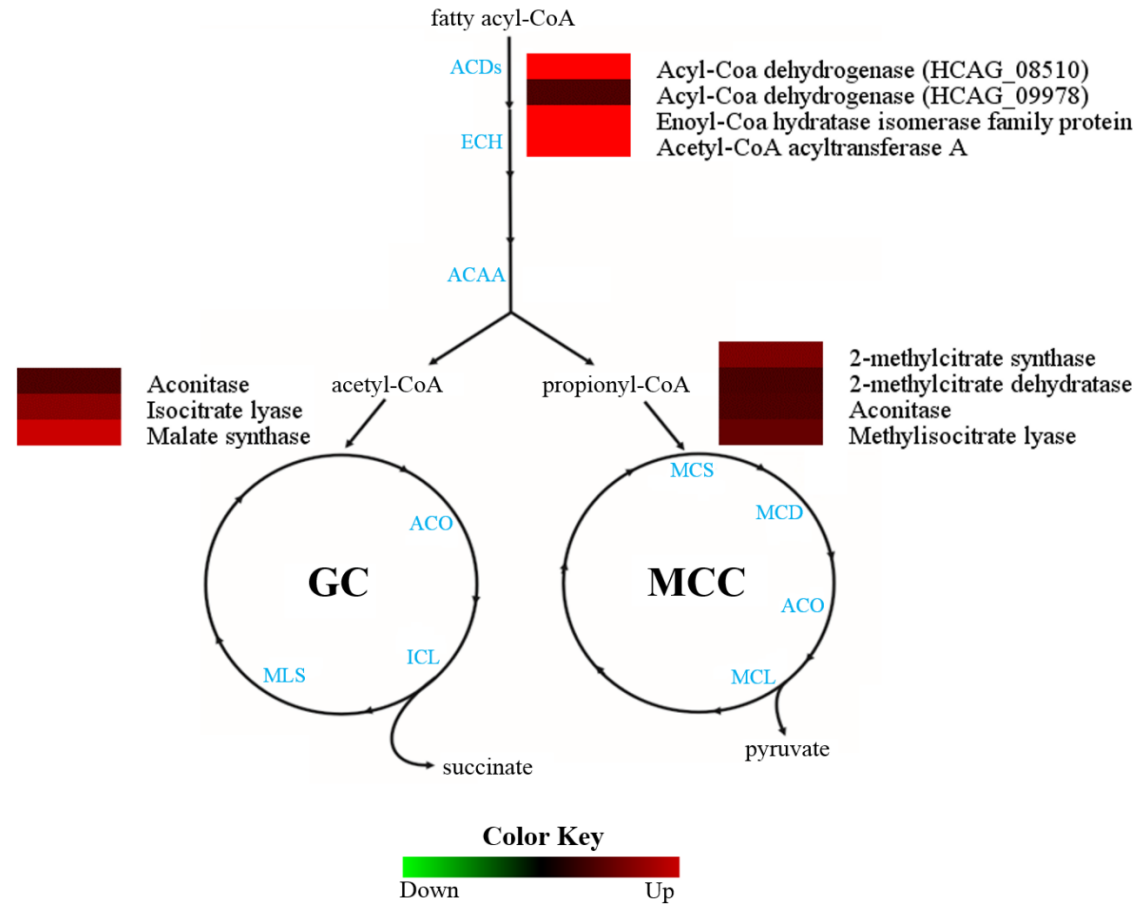
^a Identificação de proteínas diferencialmente abundantes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, UK).

^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Relação micélio/levedura: Nível de abundância em micélio dividido pelo nível em levedura.

* Proteína identificada exclusivamente em micélio.

Figura 17. Comparação de perfis proteicos relacionados a beta-oxidação, ciclo do glicoxilato e do metilcitrato em *Histoplasma capsulatum*



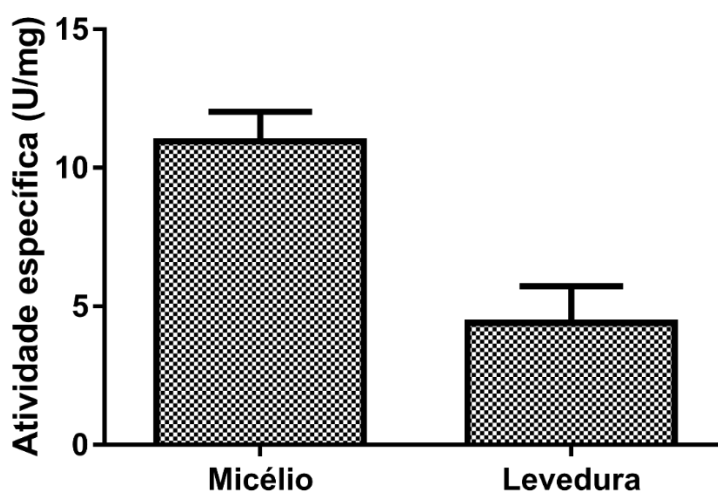
Análise de variância foi aplicada para comparar os valores de abundância entre micélio e levedura, aplicando um ponto de corte de 1,5 vezes. Os dados de abundância foram obtidos utilizando o software Multi Experiment Viewer V.4.9, que foi usado para agrupar e comparar dados de abundância. Diagrama representativo das vias da beta-oxidação, ciclo do glicoxilato e do metilcitrato que ilustram proteínas diferencialmente abundantes (azul) nas fases de micélio e levedura. As alterações nos níveis de abundância em micélio em comparação com levedura são representadas em formato de mapa de calor. Os valores médios de triplicatas experimentais são apresentados para menor abundância (verde) e para maior abundância (vermelha) de proteínas de *H. capsulatum*.

As proteínas acetil-CoA aciltransferase A (HCAG_00780), acil-CoA desidrogenase (HCAG_08510 e HCAG_09978) e enoil-CoA hidratase (HCAG_02218), são preferencialmente abundantes em micélio. Em geral, a beta-oxidação de ácidos graxos funciona preferencialmente em micélio, comparado à levedura de *H. capsulatum*, produzindo acetil-CoA e propionil-CoA.

O ciclo do glioxilato também está aumentado na condição de micélio, no qual as enzimas aconitase (HCAG_05266), isocitrato liase (ICL) (HCAG_10958) e malato sintase (HCAG_05084), são preferencialmente abundantes, permitindo a conversão de acetil-CoA e, portanto, de ácidos graxos, em substrato do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).

Em um ensaio de atividade da ICL em levedura e micélio de *H. capsulatum*, uma maior atividade desta enzima foi observada em micélio, comparado ao encontrado em levedura ($p= 0,0002$), confirmando os dados obtidos na análise proteômica relacionados ao ciclo do glioxilato (Figura 18).

Figura 18. Ensaio de atividade da isocitrato liase



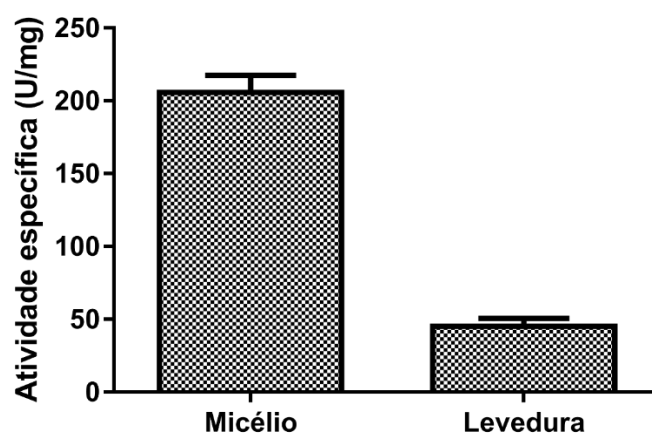
A atividade enzimática foi determinada em extratos proteicos de micélio e levedura de *H. capsulatum* como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de glioxilato-fenilidrazona por minuto, por mg de proteína total, e representada como U/mg. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas independentes. Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as duas condições com valor de $p < 0,05$.

O nível de abundância das enzimas relacionadas ao ciclo do metilcitrato estão induzidos em micélio, como demonstrado na Figura 17. As enzimas 2-metilcitrato sintase (MCS) (HCAG_05090), 2-metilcitrato desidratase

(HCAG_05094), aconitase (HCAG_05266), e metilisocitrato liase (HCAG_05089), são preferencialmente abundantes em micélio.

No intuito de confirmar os dados da análise proteômica, foi realizado um ensaio de atividade da MCS, que demonstrou uma maior atividade enzimática em micélio relacionados ao ciclo do metilcitrato ($p= 0,0001$), comparado a levedura de *H. capsulatum* (Figura 19), corroborando os dados encontrados anteriormente.

Figura 19. Ensaio de atividade da metilcitrato sintase



A atividade enzimática foi determinada em extratos proteicos de micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum*. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a liberação de 1 μmol Coenzima A por miligrama de proteína por minuto por ml. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas independentes. Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as duas condições com valor de $p < 0,05$.

5.4.1.1.4 Metabolismo de aminoácidos

Proteínas envolvidas na degradação de aminoácidos fornecendo precursores para a formação de piruvato foram predominantemente mais abundantes na fase de levedura de *H. capsulatum*. O principal destino do piruvato gerado a partir da degradação de aminoácidos é o ciclo do ácido tricarboxílico. A tabela 4 apresenta as proteínas diferencialmente abundantes em micélio quando comparadas a levedura associadas ao metabolismo de aminoácidos em *H. capsulatum*. A figura 20 esquematiza os resultados demonstrando os principais produtos da degradação dos grupos de aminoácidos

e seu destino no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), e no mapa de calor os níveis de abundância de cada enzima diferencialmente abundantes nas duas diferentes morfologias analisadas.

Tabela 4: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum* associadas ao metabolismo de aminoácidos

Número de acesso^a	Descrição da proteína^b	Score	Relação Micélio/Levedura^c
HCAG_08247	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	1660,32	**
HCAG_09984	2-isopropylmalate synthase	751,82	0,467666431
HCAG_05761	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	660,06	1,682027618
HCAG_02751	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	382,66	*
HCAG_07104	3-isopropylmalate dehydratase	2673,21	0,65050909
HCAG_00678	3-methylcrotonyl-coa carboxylase biotin containing subunit	963,26	*
HCAG_08375	4-aminobutyrate aminotransferase	2906,55	*
HCAG_05363	5-oxoprolinase	1227,86	*
HCAG_06005	Acetolactate synthase	1251,86	3,525421454
HCAG_04183	Acetylornithine deacetylase	479,28	*
HCAG_10265	Adenosylhomocysteinase	12486,09	1,632316236
HCAG_06743	Adenylosuccinate synthetase adb	1665,4	0,571209063
HCAG_10952	Alanine glyoxylate aminotransferase	414,98	**
HCAG_05679	Alanine transaminase	879,78	**
HCAG_04617	Amino transferase	789,41	*
HCAG_05224	Anthranilate synthase component I	1765,98	0,511708569
HCAG_00748	Anthranilate synthase multifunctional enzyme	568,1	**
HCAG_00035	Arginase	4072,51	0,588604987
HCAG_06102	Aspartate aminotransferase	2279,99	0,663650252
HCAG_03751	Aspartate aminotransferase	464,49	**
HCAG_08678	Aspartate aminotransferase	9312,15	0,50157607
HCAG_06360	ATP phosphoribosyltransferase	1513,2	1,50681778
HCAG_03336	Branched chain alpha keto acid dehydrogenase E1 subunit beta	582	2,773194711
HCAG_03302	Branched chain amino acid aminotransferase	539,16	5,259310669

HCAG_08945	Branched chain amino acid aminotransferase	2667	0,565525443
HCAG_00290	Chorismate mutase	1601,71	0,60653066
HCAG_01864	Copper amine oxidase	846,39	*
HCAG_04326	Cystathionine beta-synthase	1879,67	**
HCAG_04455	Cystathionine gamma synthase	383,65	*
HCAG_00220	Cysteine dioxygenase	587,28	**
HCAG_00386	Cysteine synthase o acetylserine thiol lyase	618,51	**
HCAG_01780	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase prnc	1332,85	*
HCAG_09000	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase prnc	758,52	2,611696417
HCAG_07219	Dihydrodipicolinate synthetase family protein	809,25	*
HCAG_02120	Fumarylacetoacetase hydrolase family protein	794,17	4,572225108
HCAG_07464	Gamma glutamyl phosphate reductase	2513,15	**
HCAG_08662	Glutamate decarboxylase	785,29	*
HCAG_05651	Glutamate dehydrogenase	1340,04	**
HCAG_09757	Glutamate synthase	489,43	**
HCAG_05070	Glutamine synthetase	463,23	**
HCAG_07028	Glutamine synthetase partial	3066,2	**
HCAG_03455	Glycine cleavage system H protein	700,03	*
HCAG_05962	Hercynylcysteine S-oxide lyase	455,46	*
HCAG_02357	Histidinol dehydrogenase	575,85	**
HCAG_06098	Homocitrate synthase	2328,53	0,394553708
HCAG_05721	Homogentisate 1,2-dioxygenase	1418,7	*
HCAG_03301	Homoserine acetyltransferase	502,76	*
HCAG_00014	Homoserine dehydrogenase	740,91	0,548811623
HCAG_02035	Imidazole glycerol phosphate synthase hishf	418,79	*
HCAG_04432	Indoleamine 2,3-dioxygenase family protein	2149,66	*
HCAG_00677	Isovaleryl-coa dehydrogenase	1677,65	*
HCAG_08890	Ketol acid reductoisomerase	14496,76	0,431710535
HCAG_08086	Kynureninase	586,87	*

HCAG_01655	Kynurenine-oxoglutarate transaminase	673,6	*
HCAG_09107	L aminoadipate semialdehyde dehydrogenase large subunit	502,64	**
HCAG_00676	Methylcrotonoyl-coa carboxylase beta chain	832,9	*
HCAG_06059	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	1835,48	4,48168907
HCAG_05584	Mitochondrial acetolactate synthase small subunit	763,43	0,548811623
HCAG_00029	Mitochondrial methylglutaconyl coa hydratase	381,98	**
HCAG_05073	N acetyl gamma glutamyl phosphate reductase	561,61	**
HCAG_05540	N alpha acyl glutamine aminoacylase	663,15	*
HCAG_03650	NAD specific glutamate dehydrogenase	956,08	0,463013077
HCAG_07004	O-acetylhomoserine	458,61	1,896480852
HCAG_00575	O-methyltransferase	686,02	*
HCAG_06371	Phenylacetyl-coa ligase	391,44	1,750672504
HCAG_01145	Saccharopine dehydrogenase	1217,23	1,973877746
HCAG_01575	Saccharopine reductase	2729,37	1,616074385
HCAG_07418	Serine hydroxymethyltransferase	3505,89	0,637628159
HCAG_07261	Succinate semialdehyde dehydrogenase	1092,66	*
HCAG_06253	Threonine dehydratase	369,45	**
HCAG_00793	Threonine synthase	1392,28	*
HCAG_00067	Trimethyllysine dioxygenase	379,18	4,526730751

^a Identificação de proteínas diferencialmente abundantes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, UK).

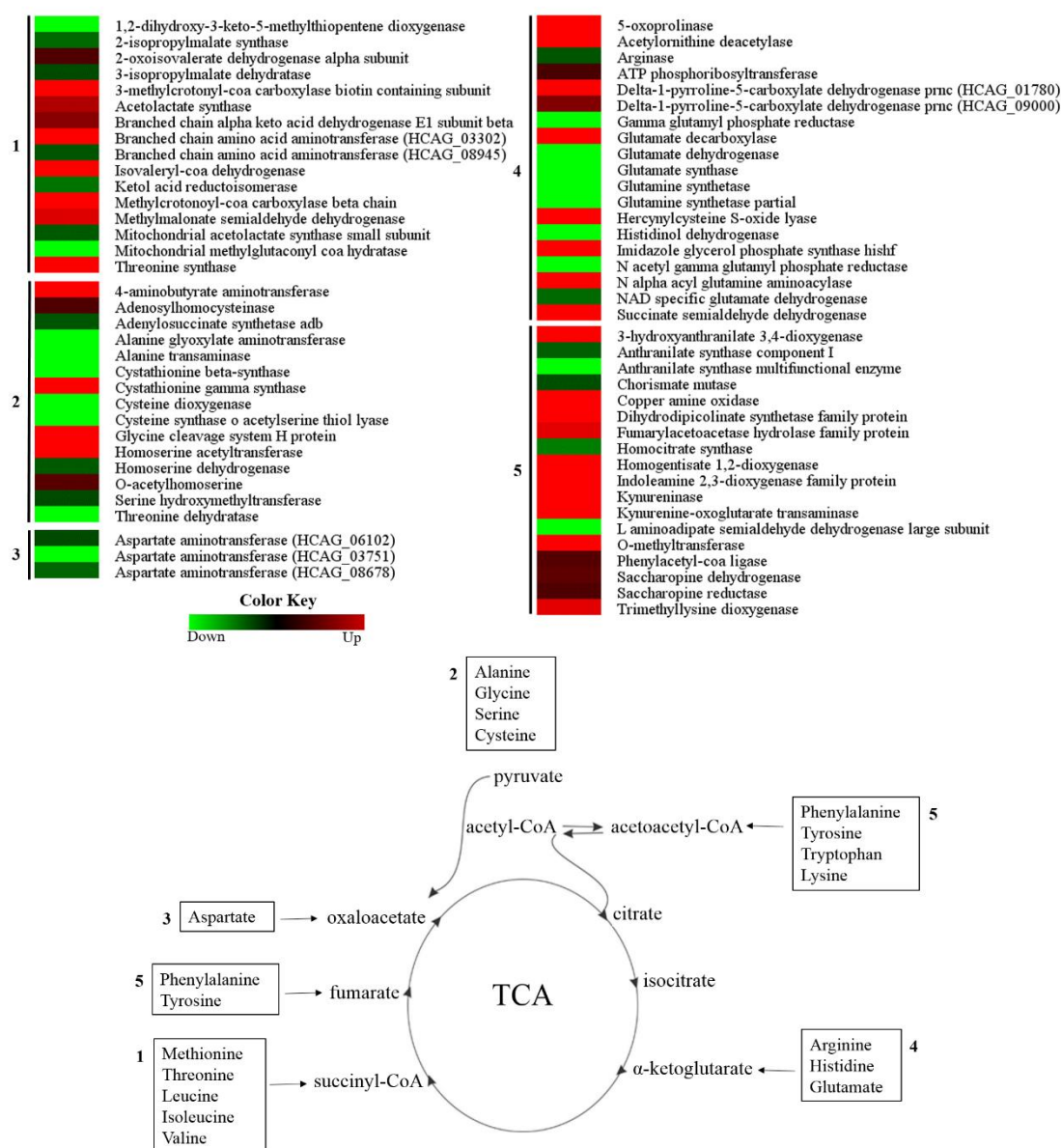
^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Relação micélio/levedura: Nível de abundância em micélio dividido pelo nível em levedura.

* Proteína identificada exclusivamente em micélio.

** Proteína identificada exclusivamente em levedura.

Figura 20. Comparação de perfis proteicos relacionados ao metabolismo de aminoácidos em *Histoplasma capsulatum*



Análise de variância foi aplicada para comparar os valores de abundância entre micélio e levedura, aplicando um ponto de corte de 1,5 vezes. Os dados de abundância foram obtidos utilizando o software Multi Experiment Viewer V.4.9, que foi usado para agrupar e comparar dados de abundância. Diagrama representativo das vias de metabolismo de aminoácidos nas fases de micélio e levedura. As alterações nos níveis de abundância em micélio em comparação com levedura são representadas em formato de mapa de calor. Os valores médios de triplicatas experimentais são apresentados para menor abundância (verde) e para maior abundância (vermelha) de proteínas de *H. capsulatum*.

As enzimas alanina transaminase (HCAG_05679) e alanina glioxilato aminotransferase (HCAG_10952) estão mais abundantes na fase leveduriforme, produzindo piruvato a partir de alanina. Também na fase leveduriforme a produção de oxaloacetato parece ser mais eficiente, uma vez que três aspartato

aminotransferases (HCAG_03751, HCAG_06102 e HCAG_08678) foram preferencialmente abundantes nesta fase.

A conversão de arginina em alfa-cetoglutarato parece predominar em levedura, uma vez que a arginase (HCAG_00035), uma enzima chave nesse processo apresentou maior abundância nesta condição.

A degradação de fenilalanina e tirosina em acetoacetil-CoA e fumarato parecem ser reguladas por pelo menos duas enzimas abundantes em micélio: fumarilacetoacetato hidrolase (HCAG_02120) e homogentisato 1,2 dioxigenase (HCAG_05721). Possivelmente, a degradação de triptofano gerando acetil-CoA deve ser maior em micélio, devido à maior abundância da quinurenina oxoglutarato transaminase (HCAG_01655) e da quinureninase (HCAG_08086) nesta fase biológica do fungo.

Histoplasma capsulatum em sua forma miceliana também é capaz de produzir eficientemente acetil-CoA a partir da degradação de leucina devido à abundância das enzimas isovaleril-Coa desidrogenase (HCAG_00677) e metilcrotonoil-CoA carboxilase (HCAG_00676).

A conversão de leucina, isoleucina e valina a succinil-CoA ocorre em micélio e em levedura, com predominância em micélio devido à maior abundância das enzimas 2-oxovalerato desidrogenase (HCAG_05761), metilmalonato-semialdeído desidrogenase (HCAG_06059) e aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (HCAG_03302). A partir da degradação de metionina e treonina, a produção de succinil-CoA se equivale nas duas fases, uma vez que maior abundância de adenosilhomocisteinase (HCAG_10265) é verificada em micélio, e de treonina desidratase (HCAG_06253) em levedura.

5.4.1.1.5 Ciclo do ácido tricarboxílico

A avaliação de proteínas relacionadas ao TCA nas condições de micélio e levedura de *H. capsulatum* foi realizada pela comparação dos níveis de abundância das enzimas listadas na Tabela 5.

Tabela 5: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum* associadas ao ciclo do ácido tricarboxílico

Número de acesso^a	Descrição da proteína^b	Score	Relação Micélio/Levedura^c
HCAG_05531	Aconitate hidratase	0	**
HCAG_01535	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase	755,11	0,625002269
HCAG_03323	Fumarate reductase flavoprotein subunit	3104,04	2,033991215
HCAG_04358	Isocitrate dehydrogenase	783,01	2,664456293
HCAG_04093	Isocitrate dehydrogenase subunit 1, mitochondrial precursor	3417,77	0,486752242
HCAG_04294	Pyruvate dehydrogenase complex component Pdx1	1551,66	**
HCAG_06317	Succinate dehydrogenase	1846,04	0,644036423
HCAG_07697	Succinyl-Coa ligase beta chain	4023,32	0,576949803

^a Identificação de proteínas diferencialmente abundantes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, UK).

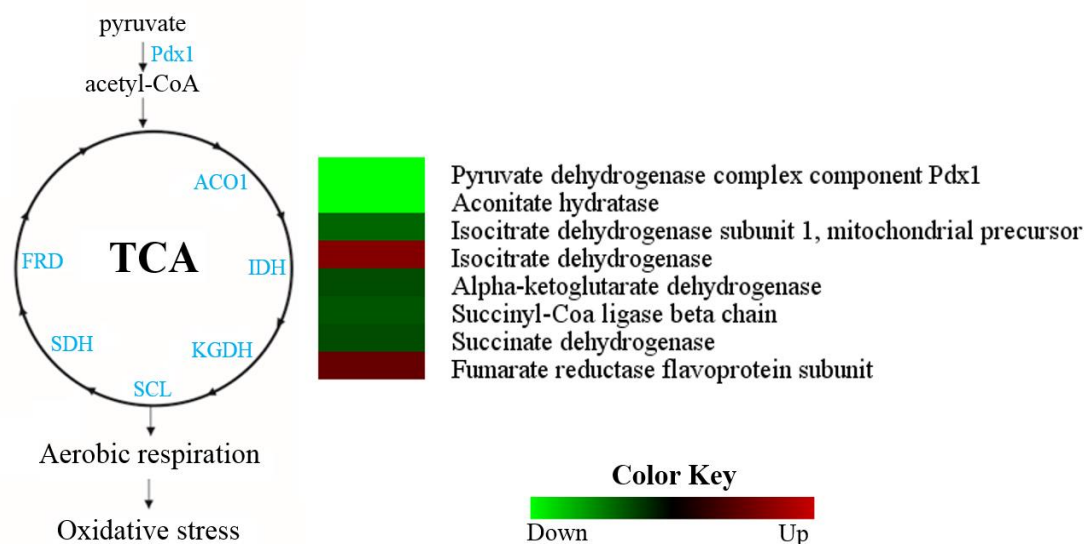
^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Relação micélio/levedura: Nível de abundância em micélio dividido pelo nível em levedura.

** Proteína identificada exclusivamente em levedura.

A enzima piruvato desidrogenase (HCAG_04294) pode promover a síntese de acetil-CoA a partir de piruvato, e tem como destino o ciclo do TCA, no qual a maioria das enzimas foram mais abundantes na fase leveduriforme de *H. capsulatum* (Figura 21). De fato, cinco enzimas envolvidas no ciclo do ácido tricarboxílico foram preferencialmente abundantes ou exclusivas em levedura: aconitato hidratase (HCAG_05531), alfa-cetoglutarato desidrogenase (HCAG_01535), isocitrato desidrogenase (HCAG_04093), succinato desidrogenase (HCAG_06317) e succinil-CoA ligase (HCAG_07697); e apenas duas em micélio: fumarato redutase (HCAG_03323) e isocitrato desidrogenase (HCAG_04358).

Figura 21. Comparação de perfis proteicos relacionados ao ciclo do ácido tricarboxílico em *Histoplasma capsulatum*



Análise de variância foi aplicada para comparar os valores de abundância entre micélio e levedura, aplicando um ponto de corte de 1,5 vezes. Os dados de abundância foram obtidos utilizando o software Multi Experiment Viewer V.4.9, que foi usado para agrupar e comparar dados de abundância. Diagrama representativo do ciclo do ácido tricarboxílico que ilustram proteínas diferencialmente abundantes (azul) nas fases de micélio e levedura. As alterações nos níveis de abundância em micélio em comparação com levedura são representadas em formato de mapa de calor. Os valores médios de triplicatas experimentais são apresentados para menor abundância (verde) e para maior abundância (vermelha) de proteínas de *H. capsulatum*.

5.4.1.1.6 Metabolismo de parede celular

A tabela 6 e a figura 22 apresentam enzimas com expressão diferencial em micélio e levedura, envolvidas na síntese e/ou degradação de biomoléculas presentes na parede celular de *H. capsulatum*.

As enzimas glicano 1,3-beta glicosidase (HCAG_01828) e 1,3-beta glicanosiltransferase (HCAG_07210), identificadas exclusivamente em levedura catalisam a reação de degradação de beta 1,3 glucana, gerando glicose como produto final.

Glucosamina frutose 6-fosfato aminotransferase (HCAG_04088), glucosamina-6-fosfato desaminase (HCAG_08152) e N-acetilglucosamina fosfato mutase (HCAG_00064) estão mais abundantes em levedura e estão relacionadas à produção de quitina para a parede celular de *H. capsulatum*. A enzima nucleosídeo-difosfato-açúcar epimerase foi encontrada com abundância preferencial na forma de micélio e a mesma catalisa a conversão do substrato utilizado na síntese de quitina, UDP-N-acetil-D-glicosamina, em UDP-N-acetilgalactosamina.

Enzimas relacionadas ao metabolismo de manose (manosil oligossacarídeo 1,2-alfa manosidase - HCAG_08449) e galactose (UDP-glicose 4-epimerase - HCAG_09614), estão mais abundantes em micélio de *H. capsulatum*. O mesmo foi observado para a tirosinase (HCAG_04336), enzima diretamente relacionada à produção de melanina.

Tabela 6: Proteínas diferencialmente abundantes em micélio e levedura de *Histoplasma capsulatum* associadas à composição da parede celular fúngica

Número de acesso ^a	Descrição da proteína ^b	Score	Relação Micélio/Levedura ^c
HCAG_07210	1,3-beta-glucanosyltransferase	424,86	**
HCAG_01828	Glucan-1,3-beta-glucosidase	394,39	**
HCAG_04088	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	5594,67	0,254106958
HCAG_08152	Glucosamine-6-phosphate deaminase	601,67	**
HCAG_08449	Mannosyl-oligosaccharide-1,2-alpha-mannosidase	382,89	*
HCAG_00064	N-acetylglucosamine-phosphate mutase	3928,04	0,58274824
HCAG_02919	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	1870,55	6,04964718
HCAG_04336	Tyrosinase	472,51	*
HCAG_09614	UDP-glucose 4-epimerase	675,05	1,552707214

^a Identificação de proteínas diferencialmente abundantes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, UK).

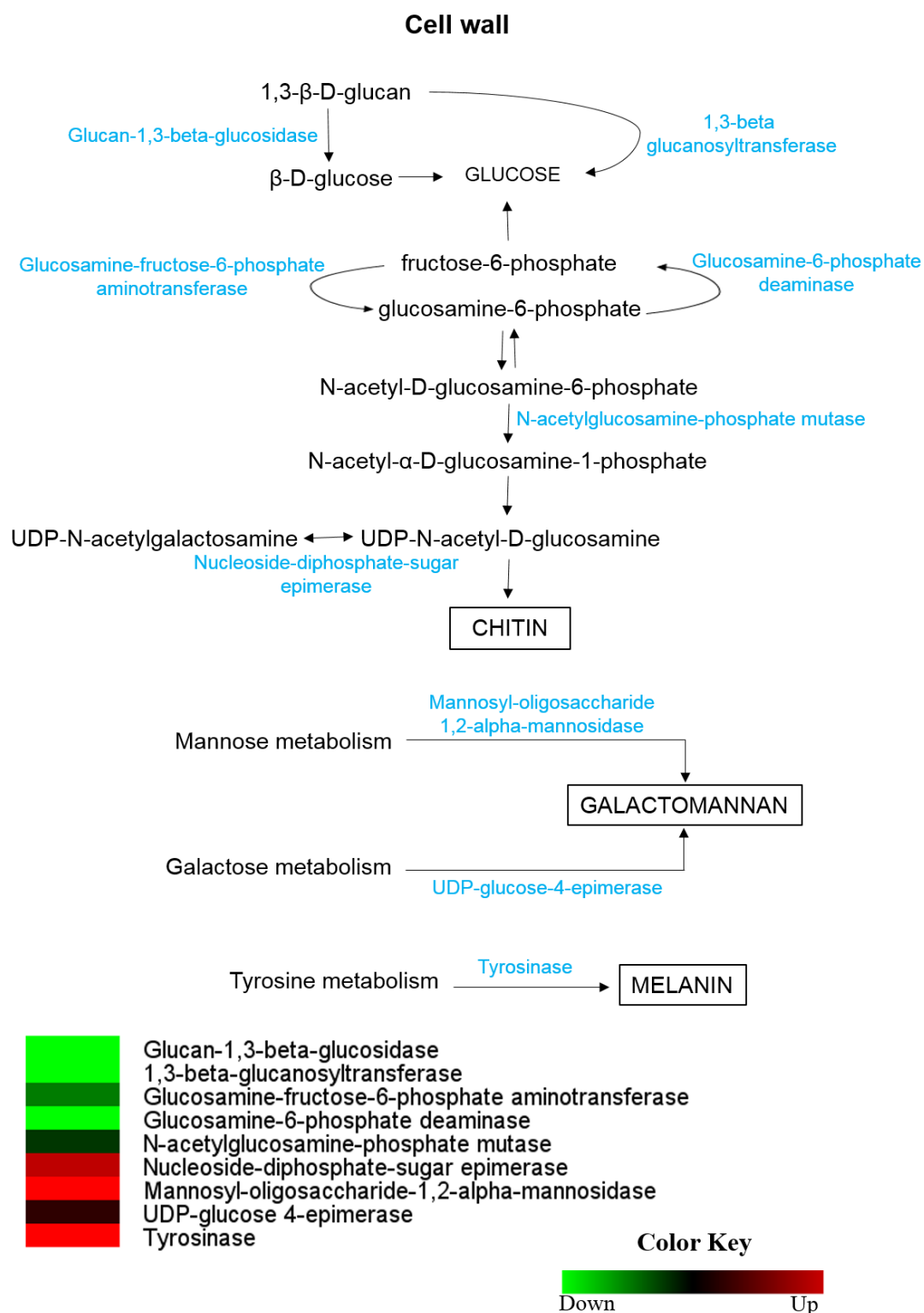
^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Relação micélio/levedura: Nível de abundância em micélio dividido pelo nível em levedura.

* Proteína identificada exclusivamente em micélio.

** Proteína identificada exclusivamente em levedura.

Figura 22. Comparação de perfis proteicos relacionados ao metabolismo da parede celular em *Histoplasma capsulatum*

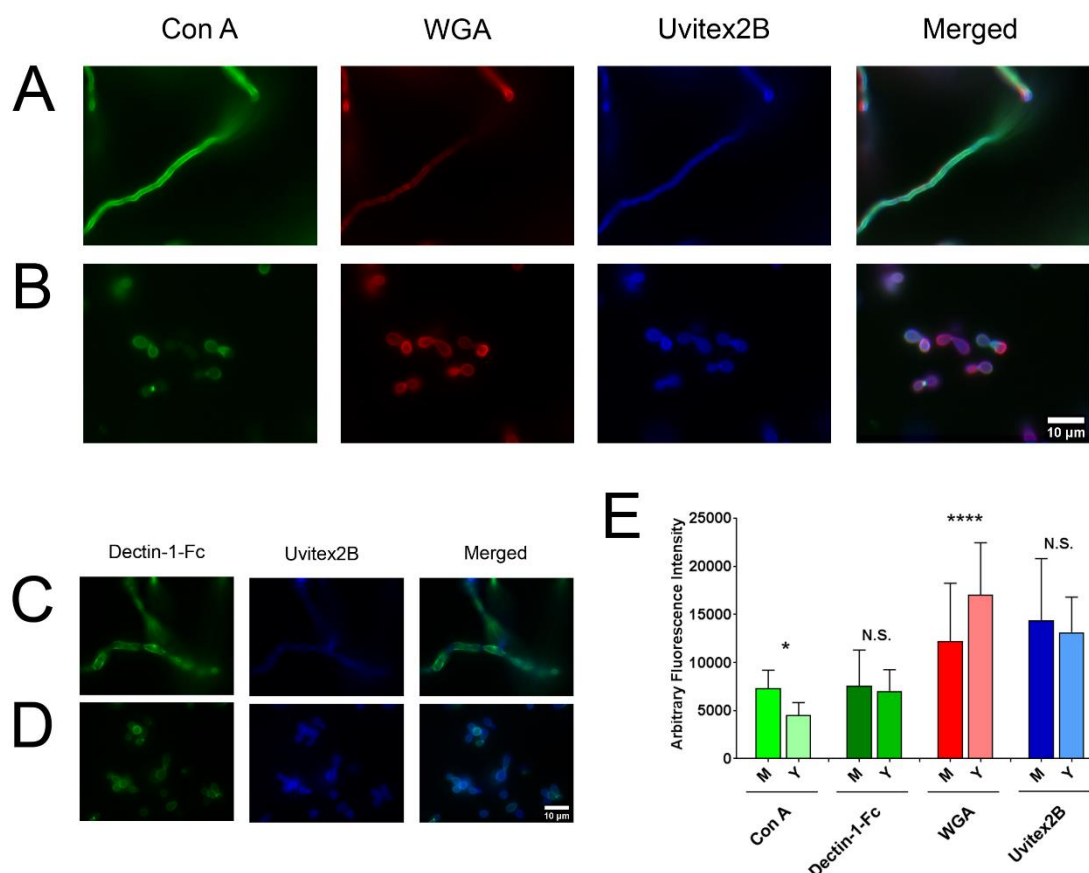


Análise de variância foi aplicada para comparar os valores de abundância entre micélio e levedura, aplicando um ponto de corte de 1,5 vezes. Os dados de abundância foram obtidos utilizando o software Multi Experiment Viewer V.4.9, que foi usado para agrupar e comparar dados de abundância. Diagrama representativo do metabolismo da parede celular que ilustram proteínas diferencialmente abundantes (azul) nas fases de micélio e levedura. As alterações nos níveis de abundância em micélio em comparação com levedura são representadas em formato de mapa de calor. Os valores médios de triplicatas experimentais são apresentados para menor abundância (verde) e para maior abundância (vermelha) de proteínas de *H. capsulatum*.

De forma a avaliar componentes da parede celular de *H. capsulatum* e comprovar achados nos dados proteômicos, foi realizada microscopia de fluorescência com marcações na parede celular de estruturas fúngicas de micélio e levedura.

A concanavalina A interage com resíduos de manose, e desta forma, apresentou uma maior intensidade de fluorescência em estruturas fúngicas da fase miceliana ($p < 0,0001$), indicando uma maior quantidade de manose na parede celular do micélio de *H. capsulatum*. Já a WGA, uma lectina com afinidade por oligômeros de quitina, apresentou uma maior intensidade de fluorescência em estruturas fúngicas da fase leveduriforme ($p < 0,0001$). No entanto, a lectina 1-Fc, que reconhece estruturas de β -1,3-glucanas não apresentou diferença estatística quando avaliada a fluorescência emitida em estruturas de micélio e levedura de *H. capsulatum* ($p = 0,7725$). Uvitex 2B foi utilizado para demarcação das dimensões da parede celular e também não apresentou diferença estatística entre as diferentes morfologias analisadas ($p = 0,0549$). Os resultados da microscopia de fluorescência utilizando os diferentes marcadores e os gráficos de intensidade de fluorescência obtidos para cada fluoróforo são apresentados na Figura 23.

Figura 23. Avaliação de componentes da parede celular de *Histoplasma capsulatum*



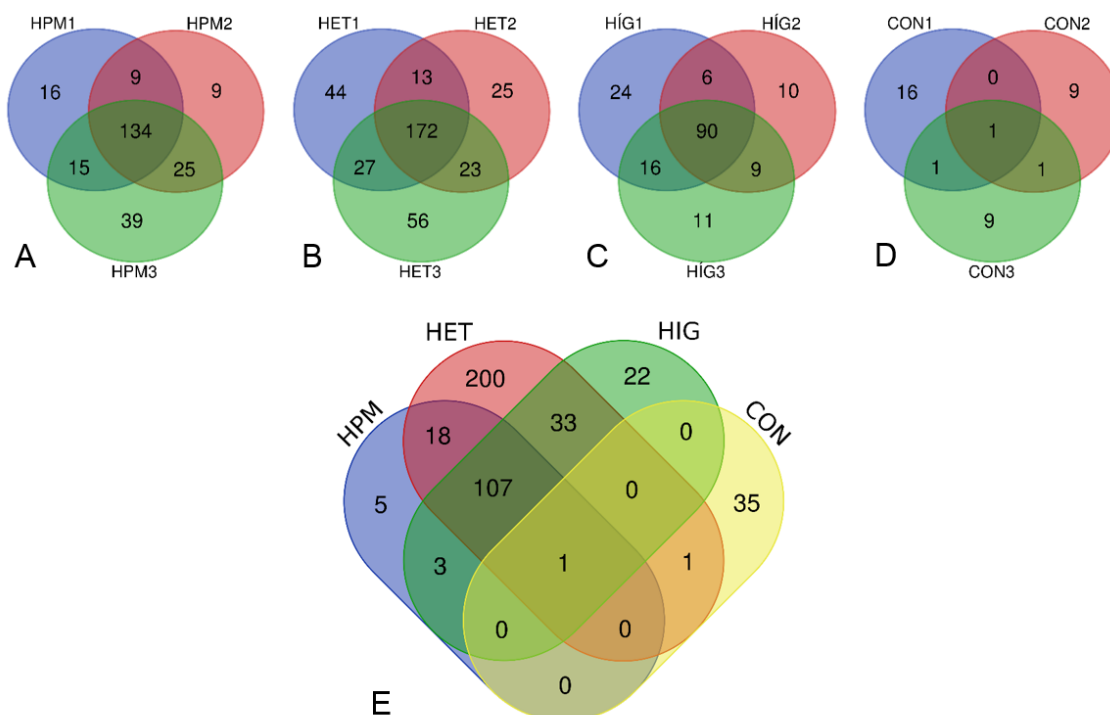
Microscopia de fluorescência mostrando o padrão de marcação em micélio (A) e levedura (B) de *H. capsulatum* por ConA-FITC, WGA (Alexa 546) e Uvitex. E de micélio (C) e levedura (D) por Dectin-1-Fc e Uvitex. Barra de escala = 10µm. (E) Gráfico demonstrando os valores de intensidade de fluorescência (em pixels), em que os dados são expressos como média ± desvio padrão. * Representa $p \leq 0,05$. N.S. representa $p > 0,05$.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS ANTIGÊNICOS

A análise das proteínas reconhecidas por anticorpos presentes em *pool* de soro de pacientes com histoplasmose revelou a presença de 134 proteínas antigênicas reconhecidas nas três replicatas realizadas do experimento frente ao extrato proteico da fase leveduriforme de *H. capsulatum*. Anticorpos presentes em *pool* de soros de pacientes com outras micoses ou tuberculose revelaram um total de 360 proteínas. Frente ao *pool* de soros de indivíduos hígidos, 166 proteínas foram reveladas e no experimento controle, 37 proteínas (Figura 24 A-D). O Apêndice E apresenta as proteínas antigênicas identificadas nas três replicatas do proteoma da fase leveduriforme de *H. capsulatum* reveladas pelos

anticorpos presentes no *pool* de soros de pacientes com histoplasmose (HPM), de acordo com a sua reatividade frente a anticorpos presentes em *pool* de soros de pacientes com outras doenças infecciosas (HET), em *pool* de soros de indivíduos hígdos (HÍG) e no experimento controle (CON).

Figura 24. Diagrama de Venn com sobreposição de proteínas identificadas por diferentes *pool*s de soros em triplicatas experimentais



A - Número de proteínas do extrato proteico da fase leveduriforme de *H. capsulatum* reconhecidas pelo *pool* de soros de pacientes com histoplasmose (HPM); B - Número de proteínas reconhecidas pelo *pool* de soros de pacientes com outras infecções fúngicas e tuberculose (HET); C - Número de proteínas reconhecidas pelo *pool* de soros de indivíduos hígdos (HÍG); D - Número de proteínas reconhecidas pelo experimento controle (CON); E - Número de proteínas reconhecidas nas três replicatas pelo *pool* de soros de HPM, número de proteínas reconhecidas ao menos em uma das três replicatas pelo *pool* de soros de HET, número de proteínas reconhecidas ao menos em uma das três replicatas pelo *pool* de soros de HÍG e número de proteínas reconhecidas ao menos em uma das três replicatas pelo experimento controle.

Inicialmente foram identificadas cinco proteínas reconhecidas pelas três replicatas experimentais com o *pool* de soros de pacientes com histoplasmose, e que não reagiram com o total de proteínas identificadas no *pool* de soros de pacientes com outras micoses e tuberculose, indivíduos hígdos ou com o experimento controle (Figura 24-E).

Ao analisar a homologia das sequências polipeptídicas das cinco proteínas reconhecidas exclusivamente a partir da ligação com anticorpos de pacientes com histoplasmose, utilizando o banco de dados do GenBank, notou-se tratar de apenas três proteínas supostamente com atividade antigênica e possivelmente específicas no diagnóstico da histoplasmose: antígeno M, catalase P e YPS-3 (Quadro 1). As outras duas proteínas consistiam em anotações diferentes para o antígeno M e a proteína YPS-3.

Quadro 1. Proteínas candidatas a possíveis alvos antigênicos no diagnóstico da histoplasmose

Antígeno M	MPSGQKGPLD RRHDTLSDPT DQFLSKFYID DEQSVLTTDV GGPIEDQHSL KAGNR GPTLL EDFIFR QKIQ HFDHERVPER AVHARGAGAH GVFTSYNNWS NITAASFLNA AGKQTPVFVR FSTVAGSRGS VDSARDIHGF ATRLYTDEGN FDIVGNVVPV FFIQDAIQFP DLIHAVKQFP DSEIPQAATA HDTAWDFLSQ QPSSLHALFW AMSGHGIPRS MR HVDGWGVH TFRLV TDEGN STLVKFRWKT LQGRAGLVWE EAQALGGKNP DFHRQDLWDA IESGRYPEWE LGFQLVNEAD QSKFDFLLD PTK IIPPEELV PFTPIGK MVL NRNPKSYFAE TEQIMFQPGH VVR GIDFTDD PLLQGR LYSY LDTQLNR HGG PNFEQLPINR PRI PFHNHNR DGAGQMFIPL NTAAYTPNSM SNGFPQQANR THNRGFFTAP GRMVNGPLVR ELSPSFNDVW SQPRLFYNSL TVFEKQFLVN AMRFENSHVR SETVRK NVII QLNR VDNDLA RRVALAIGVE PPSPDPTFYH NKATVPIGTF GTNLLRLDGL KIALLTRDDG SFTIAEQLRA AFNSANNKVD IVLVGSSLDP QRGVNMITYSG ADGSIFDAVI VVGGLLTSAS TQYPRGRPLR IITDAYAYGK PVGAVGDGSN EALR DVLMMAA GGDASNGLDQ PGVYISNDVS EAYVRSVLDG LTAYRFLNRF PLDRS
Catalase P	MGADDTFNSY RYKDTPTYTD SNGCPVMDPE SSQRVGENGP LLLQDFHLID LLAHFDRERI PERVVHAKGA GAYGEFEVLD DISDITINM LRGVGKTKL VTR FSTVGGE KGSADS ARDP RGFSTKFYTE EGNWDWVFNN TPVFFLRDPS KFPLFIHTQK RNPQTNLKDA TMFWDYLSH QEAIHQVMHL FSDRGTPYSY RHMNGYSGHT FKWLTPDGGF NYVQIHLKTD QGSKTLTNEE ATK LAAENPD WHTEDLFRAI ERGEYPSWTC YVQVLSPQQA EKFRWNIFDL TKVWPHSEVP LRRFGRVLVN KNPQNYFAEM EQAAFSPSHL VPGVEPSADP VLQSRFLFSYP DTHRHRLGVN YQIIPVNCPL RAFNPYQRDG AMAVNGNYGA NPNYPSTFRR MNYMPVKASQ EHEKWTGAVL AKQLPVTDED FVQANGLWQV LGRQPGQQAN FVK NVAGHLC NAEQK VRKAA YGMFNRVNKD LGSSIESSTE ALVASQVQSQ PRL
YPS-3	MLNIKSISTL LLLASSLLV AARP GEYPTD KDPIDK KPKP KPAPFC GTCN PISGKNHCDI TTSCINTGKR FHCACRAGEFK ASKDNYDIYK QFRLPFKNFE FLVFTPEYTE CDILCDDNTK PANELCQEVV LYKHCEHKPR FSCSSLTREV GSYVLGYSDL FFPTILNTLL ALFVCNGELV GTAG

Sequência primária de cada uma das três proteínas identificadas é apresentada com os peptídeos reconhecidos pela espectrometria de massas em negrito.

Essas três proteínas foram então analisadas pelo software DNASTar, combinando os índices de antigenicidade (algoritmo de Jameson-Wolf), ao índice de hidrofobicidade (algoritmo de Kyte-Doolittle) e a probabilidade de acessibilidade a superfície da proteína (algoritmo de Emini). Como análise adicional, um programa de predição de epítomos (BCPREDS) foi utilizado, e 13

regiões foram propostas como possíveis epítomos B dentro do antígeno M, 12 regiões na catalase P, e apenas três regiões na proteína YPS-3 (Quadro 2). Desta forma, pode-se determinar regiões propostas como epítomos B em potencial.

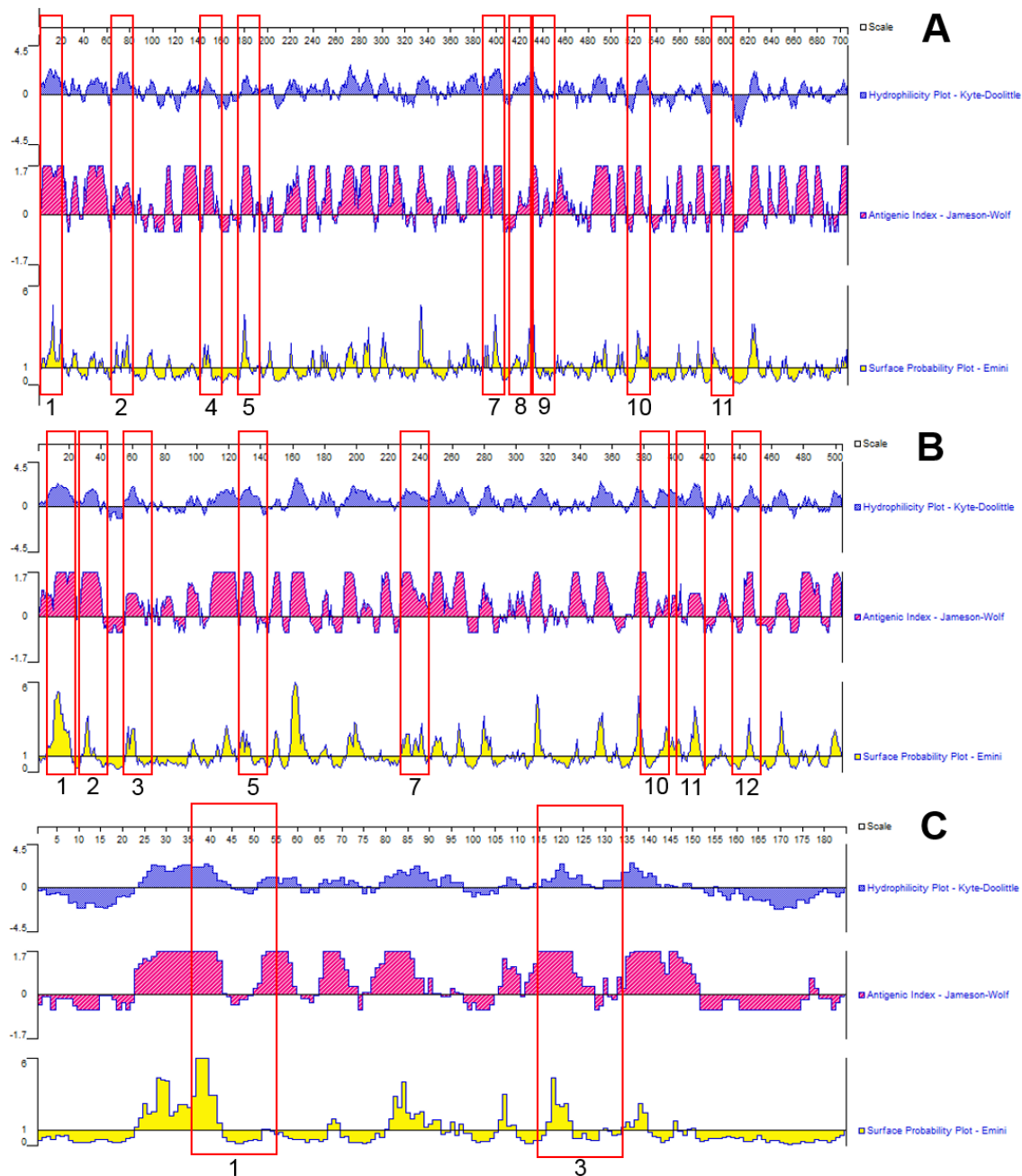
Quadro 2. Possíveis epítomos B identificados nas proteínas candidatas a alvos antigênicos para o diagnóstico da histoplasmose

Proteína	Peptídeo	Posição	Epítomo	Score
Antígeno M	1	1-20	MPSGQKGPLDRRHDTLSDPT	0,916
	2	63-82	FIFRQKIQHFDHERVPERAV	0,777
	3	84-103	ARGAGAHGVFTSYNNWSNIT	0,871
	4	141-160	ATRLYTDEGNFDIVGNNVPV	0,962
	5	175-194	AVKPQPDSEIPQAATAHDTA	0,870
	6	347-366	QPGHVVRGIDFTDDPLLQGR	0,756
	7	387-406	PINRPRIPFHNNNRDGAGQM	0,991
	8	411-430	NTAAYTPNSMSNGFPQQANR	0,970
	9	432-451	HNRGFFTAPGRMVNGPLVRE	0,938
	10	517-536	IGVEPPSPDPTFYHNKATVP	0,984
	11	588-607	LDPQRGVNMTYSGADGSIFD	0,860
	12	633-652	TDAYAYGKPVGAVGDGSNEA	0,999
	13	659-678	AAGGDASNGLDQPGVYISND	0,998
Catalase P	1	4-23	DDTFNSYRYKDTPTYTDSNG	0,991
	2	25-44	PVMDPESSQRVGENGPLLLQ	0,908
	3	56-75	DRERIPERVVHAKGAGAYGE	0,968
	4	80-99	DDISDITTINMLKGVGKTK	0,843
	5	125-144	TKFYTEEGNWDWVFNTPVF	0,960
	6	204-223	NGYSGHTFKWLTPDGGFNYV	0,840
	7	226-245	HLKTDQGSKTLTNEEATKLA	0,970
	8	323-342	AAFSPSHLVPGVEPSADPVL	0,923
	9	358-377	GVNYQQIPVNCPLRAFNPYQ	0,911
	10	379-398	DGAMAVNGNYGANPNYPSTF	0,995
	11	400-419	RMNYMPVKASQEHEKWTGAV	0,963
	12	436-455	GLWQVLGRQPGQQANFVKNV	0,986
YPS-3	1	36-55	KKPKPKPAPFCGTCNPISGK	1,000
	2	57-76	HCDITTSCINTGKRFHCACR	0,921
	3	115-134	CDDNTKPANELCQEVPLYKH	0,845

A figura 25 apresenta a sobreposição dos resultados obtidos nas duas ferramentas de bioinformática (BCPREDS e DNASStar). Sobre os gráficos gerados a partir do software DNASStar, as regiões que apresentaram localização na superfície da molécula e alto índice antigênico concordantes com as regiões dos peptídeos identificados pelo BCPREDS como possíveis epítomos B foram destacadas, sugerindo serem estas as regiões mais imunogênicas. Desta forma,

nove regiões foram propostas como mais imunogênicas no antígeno M, oito na catalase P e apenas duas na proteína YPS-3.

Figura 25. Possíveis epítomos B nas proteínas antígeno M, catalase P e YPS-3



Proteínas candidatas a alvos antigênicos para o diagnóstico da histoplasmose: A - Antígeno M; B - Catalase P; C - YPS-3. Os números sinalizados se referem aos peptídeos descritos no Quadro 2.

Ao submeter as 12 sequências polipeptídicas da catalase P, apontadas como possíveis epítomos B pelo BCPREDS, à ferramenta *Blastp* do NCBI para

busca de similaridade de sequências, cinco apresentaram homologia a catalases de mamíferos (peptídeos 3, 5, 7, 8 e 9).

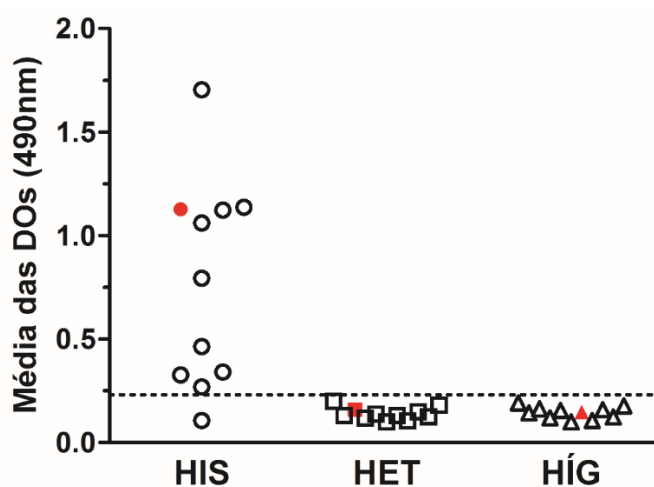
5.5.1 Análise de reatividade frente ao antígeno M por ensaios imunoenzimáticos

Devido a disponibilidade da proteína recombinante do antígeno M em nosso laboratório, ensaios enzimáticos foram realizados para comprovação dos resultados obtidos após a coimunoprecipitação e espectrometria de massas, nos quais o antígeno M foi proposto como um dos alvos antigênicos para o diagnóstico da histoplasmose.

Ao avaliar os três *pools* de soros (indivíduos com histoplasmose comprovada, indivíduos com outras infecções fúngicas e tuberculose, e indivíduos saudáveis), e cada um dos soros que os compunham pelo método de ELISA indireto, os resultados corroboram os achados na associação dos métodos de coimunoprecipitação e espectrometria de massas.

Pelo método de ELISA, soros de indivíduos com histoplasmose reagiram contra o antígeno M, exceto um (HIS 6) e soros de indivíduos com outras infecções e saudáveis não apresentaram reatividade (Figura 26).

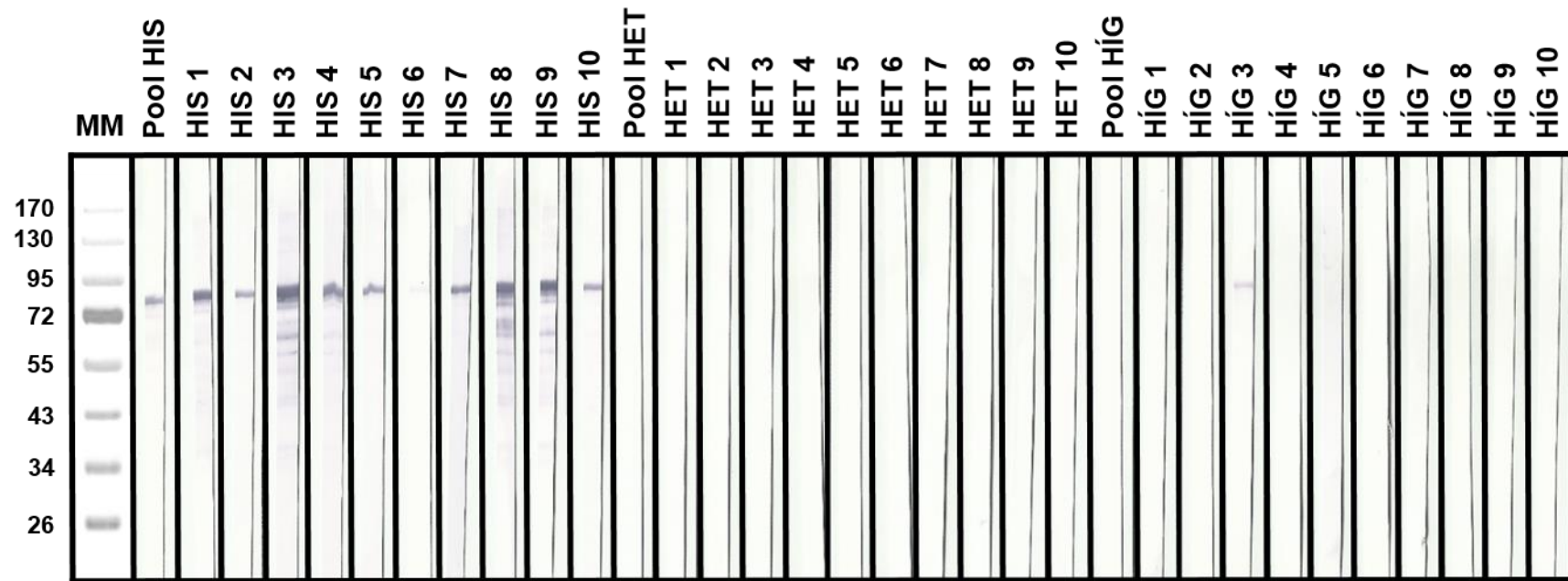
Figura 26. Detecção de anticorpos anti-antígeno M pelo método de ELISA indireto



HIS - Soros de indivíduos com histoplasmose comprovada. HET - Soros de indivíduos com outras infecções fúngicas e tuberculose. HÍG - Soros de indivíduos saudáveis. A linha horizontal pontilhada representa o *cut-off* (0,231). Em vermelho, a média das DOs dos pools de soros das três condições.

As mesmas amostras foram avaliadas pelo método de *Western blot*, no qual, todos os soros de indivíduos com histoplasmose reagiram contra o antígeno M (aproximadamente 88kDa). No entanto, soro de um indivíduo saudável (HÍG 3) apresentou reatividade contra o antígeno M (Figura 27).

Figura 27. Detecção de anticorpos anti-antígeno M pelo método de *Western blot*



Antígeno M recombinante (1,25µg) após a reação com soros de pacientes e indivíduos saudáveis. HIS - Soros de indivíduos com histoplasmose comprovada. HET - Soros de indivíduos com outras infecções fúngicas e tuberculose. HÍG - Soros de indivíduos saudáveis. MM - Massa molecular.

6 DISCUSSÃO

O dimorfismo é considerado um dos fatores associados à virulência de maior importância para a patogenicidade dos fungos dimórficos (GAUTHIER, 2017). Com isso, compreender os mecanismos moleculares subjacentes a este processo tem sido motivo de estudo no campo da pesquisa biomédica. Conhecer o perfil proteômico das duas fases do ciclo biológico de *Histoplasma capsulatum* é uma forma de melhor compreender o metabolismo deste fungo patogênico tanto na sua forma saprotrófica quanto na sua forma parasitária. Este conhecimento poderá alavancar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, diagnósticas e profiláticas a serem aplicadas à histoplasmose. Desta forma, este é o primeiro estudo que se propõe a analisar os perfis proteômicos das duas morfologias de *H. capsulatum*, micélio e levedura, e demonstra que a maioria das proteínas diferencialmente abundantes estão envolvidas em várias vias metabólicas, sugerindo uma mudança metabólica global entre micélio e levedura.

No processo de produção de energia, um aumento de várias enzimas da via glicolítica como, glicogênio fosforilase, hexoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, frutose-1 6-bifosfato aldolase e piruvato quinase foram detectadas em micélio. Em nosso modelo, possivelmente a conversão de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em piruvato ocorreu na fase miceliana já que a enzima piruvato quinase foi diferencialmente abundante, preferencialmente em micélio e a hexoquinase foi identificada exclusivamente na condição de micélio. Com isso há um aumento nos derivados de glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), os quais poderiam ser também usados em outras vias metabólicas além da glicólise.

A via das pentoses fosfato, está interligada com a glicólise nos níveis de G6P e G3P. A maior quantidade de G6P resultante da atividade da hexoquinase pode ser utilizada na via das pentoses fosfato, uma vez que a primeira enzima da via (glicose-6-fosfato 1-desidrogenase) também foi identificada apenas em micélio, assim como a enzima 6-fosfogluconolactonase. Conseqüentemente, a via das pentoses fosfato nesta fase morfológica de *H. capsulatum* também está aumentada, diferentemente dos resultados obtidos nos modelos *C. albicans* e *P.*

lutzii, nos quais as vias glicolítica e das pentoses fosfato estavam aumentadas em células leveduriformes (MONTEOLIVA et al., 2011; REZENDE et al., 2011).

No proteoma comparativo de *H. capsulatum* seis enzimas álcool desidrogenases foram exclusivamente identificadas em micélio. Aliado a esses achados, uma maior concentração de etanol em micélio sugere que o processo de fermentação alcóolica ocorra preferencialmente na fase miceliana de *H. capsulatum* semelhante ao observado em *P. brasiliensis*, isolado Pb18 (VAZ, 2014) e em *Candida albicans* (MONTEOLIVA et al. 2011). Estes estudos diferem dos resultados obtidos através o proteoma de *P. lutzii*, onde se demonstrou que processo de fermentação alcóolica ocorra preferencialmente na fase leveduriforme (REZENDE et al., 2011). Portanto, nossos resultados sugerem que o *H. capsulatum* utiliza metabolismo anaeróbico a partir de glicose.

Em fungos, HSPs atuam em resposta a vários estímulos, como mudança de pH, estresse oxidativo e aumento da temperatura (BURNIE et al., 2006). HSPs tem diversas funções, categorizações e classificações. Sua expressão adaptativa em fungos indica sua importância nessas diversas espécies, particularmente em patógenos dimórficos (CLEARE; ZAMITH-MIRANDA; NOSANCHUK, 2017). Como já era esperado, várias HSPs foram identificadas neste estudo (nove no total), todas com maior abundância ou exclusivas da fase leveduriforme.

A HSP60 foi descrita como a principal ligante de reconhecimento celular entre células de levedura de *H. capsulatum* e CD11b/CD18 (CR3) em fagócitos do hospedeiro (LONG et al. 2003), ressaltando sua importância na patogênese desse fungo. Também foi demonstrado seu papel protetor através da vacinação de três diferentes linhagens de camundongos com HSP60 conferindo proteção contra o desafio letal com células de levedura de *H. capsulatum* administradas por via intravenosa (GÓMEZ et al. 1991). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou o papel protetor em camundongos da HSP60 recombinante contra a histoplasmose pulmonar (GÓMEZ et al. 1995).

Guimarães e colaboradores (2011) propõem ainda, que HSP60 de *H. capsulatum* faça interações com outras proteínas, atuando no dimorfismo, no estresse térmico e na patogênese do fungo. Neste estudo, uma análise das redes de interações físicas com esta molécula evidenciou um possível envolvimento desta proteína nas vias de desdobraimento e translocação de

proteínas. A translocação por estresse também pode ser realizada com a ajuda de outras chaperonas, como a HSP70. Semelhanças observadas no estudo de Guimarães e colaboradores (2011) são verificadas com os achados de estudos que investigaram as interações entre chaperonas e outras proteínas no modelo de levedura *S. cerevisiae* (GONG et al. 2009, TAPLEY et al. 2009, TAPLEY et al. 2010). Ambos, *H. capsulatum* e *S. cerevisiae*, apresentaram interação de HSP60 com as chaperoninas HSP82 (HCAG_04686), SSA4 (HCAG_05805, HSP 70 kDa C precursor) e SSE1 (HCAG_00783, proteína do tipo HSP88). Além disso, também demonstraram outra interação bem caracterizada em *S. cerevisiae* em altas temperaturas com uma proteína envolvida no endereçamento de proteínas (HCAG_08833, peptidil-prolil cis-trans isomerase). Em nossa análise, todas essas cinco proteínas mencionadas acima também foram encontradas em maior abundância na condição de levedura de *H. capsulatum*.

Em microrganismos patogênicos, o catabolismo de ácidos graxos é importante para a sua virulência e sobrevivência (MUÑOZ-ELIAS et al. 2006). Ao analisar o proteoma comparativo de *H. capsulatum*, os resultados sugerem que a beta-oxidação, assim como os ciclos do glioxilato e do metilcitrato são induzidos preferencialmente em micélio em relação à levedura, diferente do que ocorreu no gênero *Paracoccidioides* (REZENDE et al., 2011; VAZ, 2014). Uma maior abundância da enzima isocitrato liase em micélio indica que nesta situação, o isocitrato ao invés de ser descarboxilado como no ciclo do ácido tricarbóxico, é clivado pela isocitrato liase em succinato e glioxilato. Na fase de micélio também foi observada maior abundância da enzima metilcitrato sintase, sugerindo que preferencialmente nesta condição, *H. capsulatum* utilize esta enzima para oxidar propionil-CoA e produzir piruvato. Em *Aspergillus fumigatus*, a deleção do gene da metilcitrato sintase levou a atenuação da virulência (BROCK et al. 2004). Estudos posteriores serão necessários para avaliação deste possível fator de virulência em *H. capsulatum*.

A degradação de aminoácidos que proporcionam os substratos para o ciclo do TCA é também um aspecto do metabolismo de *H. capsulatum* de ocorrência nas duas fases do ciclo biológico, indicando que o fungo pode degradar aminoácidos visando a obtenção de energia.

Nossos resultados demonstraram um elevado número de enzimas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos como, alanina, arginina, aspartato, fenilalanina, isoleucina, leucina, tirosina, triptofano e valina, diferentemente do observado em outros modelos (MONTEOLIVA et al. 2011; REZENDE et al., 2011; VAZ, 2014). Uma hipótese que justificaria esses achados seria o meio de cultura em que o fungo foi cultivado: *Nutrient Mixture F12 Ham*, uma mistura de sais inorgânicos, enriquecido com aminoácidos, vitaminas e outros componentes. Embora em quantidades variadas, entre 0,01 e 1mM, esta mistura contém os 20 aminoácidos essenciais que compõem as proteínas; além da suplementação com ácido glutâmico (1 g/L) e cisteína (8,4 mg/L).

Em levedura, *H. capsulatum* parece obter piruvato, oxaloacetato e alfa-cetoglutarato preferencialmente pela degradação dos aminoácidos alanina, aspartato e arginina, respectivamente, para alimentar o ciclo do TCA. Verificamos, que as enzimas-chave para a indução do ciclo do TCA foram preferencialmente abundantes em levedura em nosso modelo, dados semelhantes aos encontrados em *P. brasiliensis* - Pb18 (VAZ, 2014) e *Talaromyces marneffe* (PASRICHA et al., 2017). Já em micélio, o ciclo do TCA parece estar alimentado pela degradação de fenilalanina e tirosina em acetoacetil-CoA e fumarato, a degradação de triptofano e leucina gerando acetil-CoA, e a conversão de leucina, isoleucina e valina a succinil-CoA.

Em *C. albicans* foi descrito que o crescimento de hifas está associado a uma diminuição da atividade enzimática do ciclo do TCA e ao aumento da produção de etanol (MONTEOLIVA et al., 2011). Em *H. capsulatum* podemos sugerir que o mesmo ocorra, uma vez que enzimas relacionadas ao ciclo do TCA foram identificadas com abundância preferencial ou exclusivamente em levedura, indicando uma maior atividade enzimática nesta condição, e que o aumento da produção de etanol foi comprovado em micélio, comparado a levedura.

Em nossos resultados, a proteína fosfoglicomutase foi identificada com abundância preferencial em levedura, diferentemente do encontrado em *C. albicans*, em que a proteína foi identificada na fase de hifa (MONTEOLIVA et al, 2011), em que os autores sugerem que esta enzima esteja relacionada à conversão de G6P a glicose-1-fosfato (G1P), e posterior conversão a UDP-

glicose. Conseqüentemente, a glicose poderia ser utilizada na síntese de beta-glicanas e proteínas N- e O-glicosiladas.

Paredes celulares fúngicas são estruturas dinâmicas que são essenciais para a viabilidade celular, morfogênese e patogênese. A parede é muito mais do que a camada externa do fungo; é também uma organela dinâmica cuja composição influencia na ecologia do fungo, estando sujeita à regulação em resposta às condições ambientais e tensões impostas (GOW; LATGE; MUNRO, 2017). Glicose, seguida por manose e galactose, são os monossacarídeos mais abundantes encontrados nas paredes celulares de *H. capsulatum* durante as fases de micélio e levedura. A concentração de sacarídeos pode variar dependendo da composição do meio de cultura, das condições ambientais e do método de extração utilizado (DOMER; HAMILTON; HARKIN, 1967; KANETSUNA et al. 1974).

Glucanas são polímeros de glicose que possuem ligação glicosídica a qual se diferencia nos estágios de micélio e levedura. As α e β -glucanas presentes nas paredes celulares dessas fases morfológicas têm diferentes papéis biológicos. Enquanto a α -1,3-glucana é considerada relevante para a virulência de *H. capsulatum*, a β -1,3-glucana é uma molécula antigênica e participa da modulação da resposta imune do hospedeiro (GOROCICA et al., 2009).

Davis e colaboradores (1977) definem a β -1,3-glucana como o principal constituinte da parede celular da fase miceliana de *H. capsulatum*. Durante a transição de fase do micélio para a levedura, a síntese de α -glucana aumenta rapidamente e este efeito é estritamente dependente da temperatura. Quando a levedura se encontra a 37°C há maior síntese de α -1,3-glucana, com diminuição da síntese de β -1,3-glucana (KANETSUNA et al., 1972; KANETSUNA, 1981).

Curiosamente, embora a maioria das cepas de *Histoplasma* em todo o mundo produzam α -glucanas, um único grupo filogenético na América do Norte (NAM 2) não possui α -1,3-glucana detectável, no entanto, permanece virulento (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008). Cabe salientar que β -1,3-glucana está presente na fase miceliana deste grupo filogenético. Em nosso estudo utilizamos a cepa G217B, pertencente a Nam 2, e a presença de β -1,3-glucana foi avaliada nas estruturas de micélio e levedura deste isolado por microscopia de fluorescência após a interação com Dectina-1, caracterizada previamente como

receptor de polímeros β -1,3-glucana (BROWN, 2006). Embora sem significância estatística, uma maior intensidade de fluorescência foi observada em micélio.

As fibrilas de quitina são consideradas o esqueleto da parede celular, desempenhando um papel estrutural na manutenção da integridade e rigidez, bem como na resistência ao ambiente extracelular (RUIZ-HERRERA; OSORIO, 1974). Estudos prévios comparando as fases de levedura e micélio de *H. capsulatum* referem que as paredes de levedura continham quantidades muito maiores de quitina que as paredes de micélio (DOMER; HAMILTON; HARKIN, 1967; KANETSUNA, 1981), diferentemente de *Histoplasma farciminosum*, no qual a quantidade de quitina foi superior na forma miceliana (SAN-BLAS; CARBONELL, 1974). Nossos resultados concordam com os encontrados em *H. capsulatum*. Enzimas relacionadas à produção de quitina foram identificadas preferencialmente em levedura, e a interação com WGA, uma lectina com afinidade por oligômeros de quitina, apresentou uma maior intensidade de fluorescência na fase leveduriforme (LIEDKE et al. 2017).

Nossos resultados propõem também que micélio de *H. capsulatum* apresente uma maior quantidade de manose na composição da parede celular, dado que uma enzima relacionada ao metabolismo de manose foi identificada com exclusividade nesta condição. Esses achados ganham força com os dados de microscopia, que a partir da incubação com ConA, apresentou maior intensidade de fluorescência em micélio. Nossos resultados corroboram os dados gerados em estudos anteriores de quantificação de manose na parede celular de levedura e micélio de *H. capsulatum* e *H. farciminosum* (DOMER; HAMILTON; HARKIN, 1967; SAN-BLAS; CARBONELL, 1974).

Em *H. capsulatum*, a melanina presente na parede celular protege o fungo de extremos de temperaturas, radiação e predação no ambiente, radicais livres e agentes antifúngicos (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK 2011). E como melanina é um importante fator de virulência em outros fungos patogênicos, pode também ter um papel similar na patogênese da histoplasmose (NOSANCHUK et al. 2002). Os tipos mais comuns de melaninas fúngicas são a melanina-DHN, a eumelanina e a piomelanina (ALMEIDA-PAES et al. 2017).

A produção de melanina em *H. capsulatum* ocorre nas duas fases morfológicas. No entanto, micélio de *H. capsulatum* produz melanina sob condições normais de cultura, enquanto que levedura requer suplementação do

meio com compostos fenólicos para melanizar *in vitro* (NOSANCHUK et al., 2002).

Hwang e colaboradores (2003) identificaram genes diferencialmente expressos em *H. capsulatum*, entre eles a tirosinase, um regulador da produção de melanina em micélio. Nossos achados são concordantes com os mesmos já que esta enzima foi identificada exclusivamente no proteoma de micélio, o que justificaria a melanização de conídios relatada por Nosanchuk e colaboradores (2002). E como o meio de cultura não foi suplementado com compostos fenólicos, tirosinase não foi detectada no proteoma da fase leveduriforme.

Como descrito por Almeida-Paes e colaboradores (2017), piomelanina é um pigmento solúvel em água produzido durante o catabolismo da L-tirosina, onde o excesso de homogentisato obtido é oxidado em benzoquinona acetato e depois polimerizado, levando à síntese da piomelanina. Ao comparar a produção de piomelanina em micélio e levedura, apenas cepas cultivadas em condições de levedura produziram um pigmento solúvel compatível com piomelanina quando cresceram na presença de L-tirosina. Nossos resultados poderiam explicar este fato devido à presença de duas enzimas preferencialmente abundantes em micélio (homogentisato 1,2 dioxigenase e fumarilacetoacetato hidrolase) envolvidas que participam na degradação de homogentisato, gerando fumarato e acetoacetato ao invés de piomelanina.

Em *H. capsulatum* já foi descrito que a fase miceliana cresce com amônio como única fonte de nitrogênio e requer grupos sulfidrila na forma de cisteína. E ainda, que a adição de cisteína a um meio de sais e glicose era necessária para a manutenção da fase de levedura (SALVIN, 1949). Pouco tempo depois, Pine (1954) descobriu que, além de cisteína, os ácidos aspártico e glutâmico são estimulantes para o crescimento de levedura em meio líquido. Décadas depois, Maresca e colaboradores (1981) relatam a necessidade de cisteína para completar a transição da fase de micélio para levedura.

Cisteína dioxigenase foi a primeira cisteína oxidase isolada em um fungo, e provavelmente desempenha um papel importante na transição de fase de micélio para levedura de *H. capsulatum*, durante o qual, o potencial redox e os níveis de cisteína são fatores cruciais (KUMAR et al. 1983). Esta enzima está envolvida na conversão de L-cisteína em sulfato de cisteína através da incorporação de dois oxigênios derivados de dioxigênio sendo altamente

específica nesta reação bioquímica. A mesma foi purificada a partir da fração citosólica de células da fase leveduriforme e mostrou estar presente apenas nesta fase de *H. capsulatum* (KUMAR et al. 1983). Nossos resultados estão em consonância com esses achados uma vez que a enzima cisteína dioxigenase foi identificada exclusivamente em levedura. Outras duas enzimas envolvidas no metabolismo da cisteína foram identificadas exclusivamente na fase leveduriforme, cistationina-beta-sintase (HCAG_04326) e cisteína sintase O-acetilserina (tiol)-liase (HCAG_00386).

A proteína disulfeto isomerase foi identificada com abundância preferencial em levedura de *H. capsulatum*. Essa mesma proteína foi identificada durante a fase de transição morfológica de *P. lutzii* - Pb01 (REZENDE et al. 2011) e no fungo *Ustilago maydis* tem sido associada à transição dimórfica (BÖHMER et al. 2007). Em *Blastomyces dermatitidis*, a microscopia de força atômica de uma única molécula adesina 1 de *Blastomyces* (BAD-1) interagindo com heparina imobilizada revelou que a ligação é aumentada após o tratamento com a proteína dissulfeto isomerase e DTT, o que poderia favorecer um aumento da virulência (BEAUSSART et al. 2015). Estudos complementares da proteína disulfeto isomerase de *H. capsulatum* são necessários, uma vez que a mesma poderia também estar associada à transição dimórfica. Ou ainda, interagindo com a proteína YPS3, uma proteína localizada na parede celular de *H. capsulatum* que possui homologia com a adesina BAD1 de *B. dermatitidis* (BOHSE; WOODS, 2005), no presente estudo foi identificada exclusivamente em levedura de *H. capsulatum*, além de apresentar atividade antigênica como discutiremos a frente.

As proteínas formamidase e Y20, descritas no gênero *Paracoccidioides*, ambas propostas como fatores de virulência e com expressão preferencial na fase leveduriforme (BORGES et al. 2010; PARENTE et al. 2011; DAHER et al. 2005; FELIPE et al. 2005), também foram identificadas no proteoma comparativo de *H. capsulatum*. No entanto, ambas foram identificadas exclusivamente na condição de micélio. Estudos adicionais sobre estas proteínas são necessários para um melhor entendimento de seus papéis no modelo *Histoplasma*.

Proteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, como superóxido dismutases (HCAG_00642 e HCAG_01543) foram exclusivas em micélio quando comparado com a fase leveduriforme de *H. capsulatum*. No

gênero *Paracoccidioides* (linhagens S1, PS2 e *P. lutzii*), uma enzima superóxido dismutase com cobre e zinco (*PbSOD1*) localizada no citosol, também foi identificada com maior abundância em micélio do que em levedura (TAMAYO et al. 2016). Outras enzimas, tais como as catalases (HCAG_05109 e HCAG_08064) também foram identificadas no proteoma de *H. capsulatum*, a catalase A foi identificada exclusivamente e a catalase B com maior abundância em micélio. Nossos achados corroboram os dados de Johnson e colaboradores (2002), que ao avaliar a expressão diferencial das catalases, concluíram que a catalase A é mais abundante em micélio do que em levedura, e a catalase B foi expressa em ambas as fases.

Considerando todas as diferenças encontradas no perfil de proteínas diferencialmente abundantes nas duas morfologias de *H. capsulatum*, aquelas presentes na forma miceliana podem ser futuros alvos no desenvolvimento de vacinas, as vias metabólicas preferenciais em levedura podem ser candidatas a novos alvos terapêuticos e proteínas presentes na forma de levedura são candidatas a antígenos que estimulem a resposta imune humoral e, com isso, possam ser utilizadas como alvos no diagnóstico da histoplasmose através da pesquisa de anticorpos específicos. Desta forma, realizamos técnica de coimunoprecipitação para tentar identificar proteínas da fase leveduriforme que possam ser futuramente aplicadas no desenvolvimento de novos testes diagnósticos.

O diagnóstico definitivo da histoplasmose se dá pelo isolamento e identificação de *H. capsulatum* em espécimes clínicos. No entanto, apresenta limitações como resultado tardio, baixa sensibilidade em algumas formas clínicas da doença, além de necessitar de mão de obra qualificada para coleta, cultivo e identificação do fungo, e de estrutura laboratorial de biossegurança nível três. Por outro lado, testes imunológicos (detecção de anticorpos e antígenos) são mais rápidos e sensíveis, podem ser automatizados ou semi-automatizados e não necessitam de procedimentos invasivos (WHEAT et al. 2016; AZAR; HAGE, 2017).

Um grande esforço na busca pelo desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico mais acurado das doenças infecciosas tem sido feito (CELIK; KOCABAS, 2007). E a utilização de ferramentas imunoproteômicas para identificação de novos alvos antigênicos tem sido amplamente utilizada, inclusive

em fungos patogênicos (LUO et al. 2016; KNIEMEYER et al. 2016; RODRIGUES et al. 2015; HERNÁNDEZ-HARO et al. 2015; MARTINS et al. 2013).

No presente estudo, três proteínas obtidas da fase leveduriforme de *H. capsulatum* e identificadas a partir de ferramentas proteômicas são propostas como alvos antigênicos: antígeno M, catalase P e YPS-3.

Em estudos prévios de nosso grupo, o antígeno M teve sua natureza biológica identificada, foi caracterizado estruturalmente e determinada sua expressão na superfície celular da levedura, além de caracterizado como antígeno com utilidade no diagnóstico da histoplasose (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2008). No entanto, as proteínas catalase P e YPS-3, foram estudadas e caracterizadas como fatores de virulência em *H. capsulatum* (JOHNSON et al., 2002; BOHSE; WOODS, 2007), porém ainda não descritas como alvos antigênicos.

Em *H. capsulatum*, catalase P já foi descrita como fator de virulência e está envolvida na resposta ao stress oxidativo. Ela é referida como uma proteína com similaridade com catalases peroxissomais conhecidas de animais e leveduras da ordem *Saccharomycotina* (JOHNSON et al., 2002). A homologia com catalases de animais foi confirmada por nossos achados, que ao submeter as 12 sequências polipeptídicas da catalase P apontadas como possíveis epítomos B à ferramenta *Blastp* do NCBI para busca de similaridade de sequências, cinco apresentaram homologia a catalases de mamíferos.

A proteína YPS-3, presente na parede celular e também liberada em meio de cultura, é produzida apenas durante a fase leveduriforme de *H. capsulatum* (BOHSE; WOODS, 2005). Sua localização sugere que YPS3 seja uma proteína capaz de ser reconhecida por anticorpos e os resultados do presente estudo mostram pela primeira vez o potencial antigênico desta proteína.

Estudo prévio propõe que YPS3 atue como fator de virulência, sugerindo sua importância na progressão da doença disseminada, uma vez que, quando sua produção foi bloqueada por RNAi em infecção animal, os mutantes apresentaram diminuição significativa da disseminação fúngica (BOHSE; WOODS, 2007).

Surpreendentemente, o antígeno H de *H. capsulatum*, identificado como específico para o diagnóstico da histoplasose e utilizado para discriminar infecção ativa da doença (JACOBSON; STRAUS, 1983; AZAR; HAGE, 2017),

não foi detectado em nossos experimentos. Este fato talvez seja justificado pelo fato do antígeno H ser menos imunogênico que o antígeno M e a presença de anticorpos anti-H ocorra em menos de 25% dos pacientes (WHEAT et al., 2016). Outra justificativa seria que o extrato proteico avaliado neste estudo foi de proteínas totais (excluindo proteínas contidas no secretoma), e embora o antígeno H tenha sido apontado como componente de superfície celular (GUIMARÃES; DE CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011), outros trabalhos o apontam como uma proteína secretada pelo fungo, utilizando a mesma cepa empregada em nosso estudo (DEEPE; DUROSE, 1995; FISHER; WOODS, 2000).

Os ensaios imunoenzimáticos realizados utilizando o antígeno M recombinante, ELISA indireto e *Western blot*, apresentaram resultados um pouco distintos. Acredita-se que essa diferença esteja relacionada à conformação antigênica (epítomos conformacionais ou lineares) do antígeno M nos dois testes, resultando em maior ou menor exposição de epítomos presentes na molécula.

Um fato que justificaria o resultado falso negativo no ELISA indireto seria o fato de tratar-se de um paciente recém diagnosticado com a síndrome da imunodeficiência adquirida e virgem de tratamento antirretroviral, onde a ausência de anticorpos detectáveis pode estar associada ao estágio avançado de imunodeficiência, seja humoral ou a partir da formação de imunocomplexos (GUIMARÃES et al., 2004). Este paciente teve seu caso previamente relatado, no qual apresentou contagem de linfócitos T CD4 + de 20 células/mm e foi diagnosticado com múltiplas infecções fúngicas. Foram comprovados os diagnósticos de histoplasmose, criptococose e pneumocistose, além de tuberculose (ALMEIDA-SILVA et al., 2016). Pela reação de *Western blot*, o soro deste paciente reconheceu o antígeno M recombinante, embora fracamente.

No que se refere ao resultado falso positivo encontrado na técnica de *Western blot*, um indivíduo saudável, Wheat (2001) propõe que anticorpos possam ter surgido no passado, a partir da exposição a *H. capsulatum*, uma vez que a maior parte dos casos de histoplasmose são subclínicos, e anticorpos anti-M podem permanecer por vários anos, mesmo após a recuperação do paciente. Ou até mesmo em indivíduos saudáveis residentes em área endêmica de histoplasmose (BROCK et al., 1984) como é o caso do estado do Rio de Janeiro (AIDÉ, 2009).

Estudos complementares utilizando uma maior amostragem de soros de todos os grupos estudados se fazem necessários para uma análise mais completa da utilidade do antígeno M recombinante para o diagnóstico da histoplasmose, bem como das duas outras moléculas identificadas neste estudo.

Nossos dados proteômicos sugerem que durante a transição morfológica de *H. capsulatum* ocorra uma reorganização metabólica, de forma a permitir uma melhor adaptação do fungo às condições impostas pelo hospedeiro durante o parasitismo, o que pode ser evidenciado por: (i) tolerância ao aumento de temperatura, sinalizado pela abundância de HSPs na fase leveduriforme; (ii) resposta ao estresse oxidativo imposto pelo sistema imunológico, regido pela ação da tiorredoxina redutase (exclusiva em levedura), assim como ocorre em *Scedosporium apiospermum* (STAERCK et al., 2018); e (iii) utilização de proteínas como fonte de energia, demonstrada pela diversidade de enzimas associadas à degradação de proteínas e aminoácidos. Importante ressaltar ainda que, componentes proteicos da fase leveduriforme de *H. capsulatum* se mostraram como potenciais alvos antigênicos a serem empregados no diagnóstico da histoplasmose.

7 CONCLUSÕES

- ✓ As fases miceliana e leveduriforme de *H. capsulatum* apresentam perfis proteômicos distintos, indicando significativa diferença no metabolismo global de ambas as fases.
- ✓ A presença de enzimas específicas indica que *H. capsulatum* preferencialmente utiliza a degradação de glicose e de ácidos graxos como fonte de energia anaeróbica na fase saprotrófica, enquanto que na fase parasitária obtém energia de forma aeróbica a partir da degradação de aminoácidos.
- ✓ O proteoma de *H. capsulatum* sugere que em resposta à alteração morfológica, ocorra um remodelamento da parede celular.
- ✓ O método de coimunoprecipitação é eficiente na predição de alvos antigênicos específicos de *H. capsulatum*;
- ✓ Três proteínas da fase leveduriforme de *H. capsulatum* são candidatas a alvos antigênicos específicos, podendo ser avaliadas suas aplicabilidades ao imunodiagnóstico da histoplasmose.

8 PERSPECTIVAS

- ✓ Investigar a expressão de genes envolvidos nos processos metabólicos com maior diferença de abundância encontrados no proteoma, por RTq-PCR em tempo real.
- ✓ Avaliar o proteoma de *H. capsulatum* utilizando uma cepa isolada de ambiente no estado do Rio de Janeiro.
- ✓ Avaliar o imunoenensaio ELISA indireto para detecção de anticorpos utilizando o antígeno M em um número maior de amostras.
- ✓ Clonar, expressar e purificar as proteínas recombinantes catalase P e YPS-3.
- ✓ Padronizar ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos, utilizando como antígenos as proteínas catalase P e YPS-3.
- ✓ Produzir anticorpos monoclonais anti-antígeno M, catalase P e YPS-3 para desenvolver imunoenaios de detecção de antígenos a serem aplicados no imunodiagnóstico da histoplasmose.

REFERÊNCIAS

- AIDÉ, M. A. Chapter 4-histoplasmosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 11, p. 1145-51, 2009.
- ALBRECHT, D. et al. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 32, 2010.
- ALMEIDA, M. A. et al. Validation of western blot for *Histoplasma capsulatum* antibody detection assay. **BMC Infect Dis**, v. 16, p. 87, 2016.
- ALMEIDA, M. A. et al. Role of western blot assay for the diagnosis of histoplasmosis in AIDS patients from a National Institute of Infectious Diseases in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycoses**, 2018.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. L-tyrosine induces the production of a pyomelanin-like pigment by the parasitic yeast-form of *Histoplasma capsulatum*. **Med Mycol**, v. 56, n. 4, p. 506-509, 2018.
- ALMEIDA-SILVA, F. et al. Multiple opportunistic fungal infections in an individual with severe HIV disease: A case report. **Rev Iberoam Micol**, v. 33, n. 2, p. 118-21, 2016.
- ARAÚJO, D. S. et al. Employing proteomic analysis to compare *Paracoccidioides lutzii* yeast and mycelium cell wall proteins. **Biochim Biophys Acta Proteins Proteom**, v. 1865, n. 11, p. 1304-1314, 2017.
- ARAVALLI, R. N. et al. *Histoplasma capsulatum* yeast phase-specific protein Yps3p induces Toll-like receptor 2 signaling. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 30, 2008.
- ASIF, A. R. et al. Analysis of the cellular *Aspergillus fumigatus* proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis. **Electrophoresis**, v. 31, n. 12, p. 1947-58, 2010.
- ASSI, M. et al. Histoplasmosis after solid organ transplant. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 11, p. 1542-9, 2013.
- AZAR, M. M.; HAGE, C. A. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 55, n. 6, p. 1612-1620, 2017.
- BAEZA, L. C. et al. Differential Metabolism of a Two-Carbon Substrate by Members of the *Paracoccidioides* Genus. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2308, 2017.
- BATANGHARI, J. W. et al. *Histoplasma* acquisition of calcium and expression of CBP1 during intracellular parasitism. **Mol Microbiol**, v. 27, n. 3, p. 531-9, 1998.

BEAUSSART, A. et al. *Blastomyces* Virulence Adhesin-1 Protein Binding to Glycosaminoglycans Is Enhanced by Protein Disulfide Isomerase. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01403-15, 2015.

BÖHMER, M. et al. Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 675-85, 2007.

BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Surface localization of the Yps3p protein of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 4, p. 685-93, 2005.

BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Expression and interstrain variability of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 4, p. 609-15, 2007.

BORGES, C. L. et al. Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. **FEMS Yeast Res**, v. 10, n. 1, p. 104-13, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BROCK, EG. et al. Effect of periodate oxidation on the detection of antibodies against the M-antigen of histoplasmin by enzyme immunoassay (EIA) inhibition. **Current Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 177-180, 1984.

BROCK, M.; BUCKEL, W. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 15, p. 3227-41, 2004.

BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 1, p. 33-43, 2006.

BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity with supernatants from antigen-stimulated immune spleen cell cultures. **Infect Immun**, v. 45, n. 2, p. 447-52, 1984.

BULLOCK, W. E.; WRIGHT, S. D. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. **J Exp Med**, v. 165, n. 1, p. 195-210, 1987.

BURNIE, J. P. et al. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, n. 1, p. 53-88, 2006.

CANO, M. V.; HAJJEH, R. A. The epidemiology of histoplasmosis: a review. **Semin Respir Infect**, v. 16, n. 2, p. 109-18, 2001.

CANTEROS, C. E. et al. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: seroepidemiological study in dogs. **Rev Iberoam Micol**, v. 27, n. 1, p. 14-9, 2010.

- CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist (London)**, v. 49, n. 2, p. 58-62, 2002.
- CELIK, U.; KOCABAS, E. New diagnostic tool of tuberculosis: interferon-gamma assays. **Tuberk Toraks**, v. 55, n. 1, p. 108-17, 2007.
- CHANDLER, J. M. et al. Protein profiling of the dimorphic, pathogenic fungus, *Penicillium marneffeii*. **Proteome Sci**, v. 6, p. 17, 2008.
- CHAO, L. Y.; RINE, J.; MARLETTA, M. A. Spectroscopic and kinetic studies of Nor1, a cytochrome P450 nitric oxide reductase from the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Arch Biochem Biophys**, v. 480, n. 2, p. 132-7, 2008.
- CHICK, E. W. et al. Hitchcock's birds, or the increased rate of exposure to *Histoplasma* from blackbird roost sites. **Chest**, v. 80, n. 4, p. 434-8, 1981.
- CLEARE, L. G.; ZAMITH-MIRANDA, D.; NOSANCHUK, J. D. Heat Shock Proteins in *Histoplasma* and *Paracoccidioides*. **Clin Vaccine Immunol**, v. 24, n. 11, 2017.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med Mycol**, v. 49, n. 8, p. 785-98, 2011.
- CORCHO-BERDUGO, A. et al. An unusual outbreak of histoplasmosis in residents of the state of Mexico. **Gac Med Mex**, v. 147, n. 5, p. 377-84, 2011.
- DAHER, B. S. et al. The highly expressed yeast gene pby20 from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 5, p. 434-43, 2005.
- DARLING, S. T. A protozoon general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymphonodes. **JAMA**, v. 46, p. 1283-5, 1906.
- DAVIS, T. E.; DOMER, J. E.; LI, Y. T. Cell wall studies of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* using autologous and heterologous enzymes. **Infect Immun**, v. 15, n. 3, p. 978-87, 1977.
- DE CURCIO, J. S. et al. Identification of membrane proteome of *Paracoccidioides lutzii* and its regulation by zinc. **Future Sci OA**, v. 3, n. 4, p. FSO232, 2017.
- DE DEUS FILHO, A. et al. Histoplasmosis in the northeast of Brazil. Report of three cases. **Rev Port Pneumol**, v. 15, n. 1, p. 109-14, 2009.
- DEEPE, G. S.; DUROSE, G. G. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 63, n. 8, p. 3151-7, 1995.

DIAS, M. A. et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban area of São Paulo State, Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 139, n. 10, p. 1642-4, 2011.

DOMER, J. E.; HAMILTON, J. G.; HARKIN, J. C. Comparative study of the cell walls of the yeastlike and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. **J Bacteriol**, v. 94, n. 2, p. 466-74, 1967.

EBEL, F. et al. Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. **Fungal Genet Biol**, v. 43, n. 7, p. 476-89, 2006.

ESPINOSA-AVILÉS, D. et al. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). **J Zoo Wildl Med**, v. 39, n. 3, p. 450-4, 2008.

FALCI, D. R. et al. Progressive disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 7-11, 2017.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 24706-14, 2005.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 192-8, 2009.

FISHER, K. L.; WOODS, J. P. Determination of beta-glucosidase enzymatic function of the *Histoplasma capsulatum* H antigen using a native expression system. **Gene**, v. 247, n. 1-2, p. 191-7, 2000.

FRÍAS-DE-LEÓN, M. G. et al. Usefulness of molecular markers in the diagnosis of occupational and recreational histoplasmosis outbreaks. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 62, n. 2, p. 111-116, 2017.

GAUTHIER, G. M. Fungal Dimorphism and Virulence: Molecular Mechanisms for Temperature Adaptation, Immune Evasion, and In Vivo Survival. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 8491383, 2017.

GEROMANOS, S. J. et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1683-95, 2009.

GOMEZ, F. J.; ALLENDOERFER, R.; DEEPE, G. S. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. **Infect Immun**, v. 63, n. 7, p. 2587-95, 1995.

GOMEZ, F. J.; GOMEZ, A. M.; DEEPE, G. S. Protective efficacy of a 62-kilodalton antigen, HIS-62, from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells. **Infect Immun**, v. 59, n. 12, p. 4459-64, 1991.

GONG, Y. et al. An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. **Mol Syst Biol**, v. 5, p. 275, 2009.

GOODWIN, R. A.; DES PREZ, R. M. Pathogenesis and clinical spectrum of histoplasmosis. **South Med J**, v. 66, n. 1, p. 13-25, 1973.

GOODWIN, R. A.; LOYD, J. E.; DES PREZ, R. M. Histoplasmosis in normal hosts. **Medicine (Baltimore)**, v. 60, n. 4, p. 231-66, 1981.

GOROCICA, P. et al. The interaction between *Histoplasma capsulatum* cell wall carbohydrates and host components: relevance in the immunomodulatory role of histoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 492-6, 2009.

GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiol Spectr**, v. 5, n. 3, 2017.

GUIMARÃES, A. J. et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. **J Med Microbiol**, v. 53, n. 6, p. 509-14, 2004.

GUIMARÃES, A. J. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using purified, deglycosylated histoplasmin for different clinical manifestations of histoplasmosis. **Microbiol Res (Pavia)**, v. 1, n. 1, 2010.

GUIMARÃES, A. J.; DE CERQUEIRA, M. D.; NOSANCHUK, J. D. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. **Front Microbiol**, v. 2, p. 225, 2011.

GUIMARÃES, A. J. et al. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 77, n. 4, p. 1357-67, 2009.

GUIMARÃES, A. J. et al. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3449, 2008.

GUIMARÃES, A. J. et al. *Histoplasma capsulatum* heat-shock 60 orchestrates the adaptation of the fungus to temperature stress. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e14660, 2011.

GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. DIAGNOSIS OF HISTOPLASMOSIS. **Braz J Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2006.

GUIMARÃES, A. J. et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. **J Med Microbiol**, v. 53, n. 6, p. 509-14, 2004.

GURNEY, J. W.; CONCES, D. J. Pulmonary histoplasmosis. **Radiology**, v. 199, n. 2, p. 297-306, 1996.

HEARN, V. Structure and function of the fungal cell wall. In: JACOBS, P. e NALL, L. (Ed.). *Fungal Diseases: Biology, immunology ADN diagnosis*. New York: Marcel Dekker, 1997. p.27-60.

HERNÁNDEZ-HARO, C. et al. Immunoproteomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* systemic infection in a murine model. **J Proteomics**, v. 112, p. 14-26, 2015.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res**, v. 111, n. 5, p. 509-47, 2007.

HILTY, J.; GEORGE SMULIAN, A.; NEWMAN, S. L. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. **Med Mycol**, v. 49, n. 6, p. 633-42, 2011.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. **Infect Immun**, v. 62, n. 8, p. 3543-6, 1994.

HOLBROOK, E. D.; RAPPLEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 318-24, 2008.

HOLBROOK, E. D. et al. Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. **J Proteome Res**, v. 10, n. 4, p. 1929-43, 2011.

HOWARD, D. H. Studies on the catalase of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 39, n. 3, p. 1161-6, 1983.

HWANG, L. et al. Identifying phase-specific genes in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* using a genomic shotgun microarray. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 6, p. 2314-26, 2003.

HWANG, L. H. et al. *Histoplasma* requires SID1, a member of an iron-regulated siderophore gene cluster, for host colonization. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 4, p. e1000044, 2008.

IGNATOV, A.; KEATH, E. J. Molecular cell biology and molecular genetics of *Histoplasma capsulatum*. **Int J Med Microbiol**, v. 292, n. 5-6, p. 349-61, 2002.

JACOBSON, E. S.; STRAUS, S. E. Serologic tests for histoplasmosis. **Ann Intern Med**, v. 98, n. 4, p. 560-1, 1983.

JOHNSON, C. H. et al. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. **Microbiology**, v. 148, n. 4, p. 1129-42, 2002.

JOHNSON, C. H. et al. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. **Yeast**, v. 20, n. 5, p. 381-8, 2003.

KANETSUNA, F. et al. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 110, n. 1, p. 208-18, 1972.

KANETSUNA, F. Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. **Sabouraudia**, v. 19, n. 4, p. 275-86, 1981.

KANETSUNA, F. et al. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeastlike and mycelial forms of *Histoplasma capsulatum*. **Mycopathol Mycol Appl**, v. 54, n. 1, p. 1-13, 1974.

KASUGA, T. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Mol Ecol**, v. 12, n. 12, p. 3383-401, 2003.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 115-32, 2007.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 314-9, 2007.

KNIEMEYER, O. et al. Immunoproteomics of *Aspergillus* for the development of biomarkers and immunotherapies. **Proteomics Clin Appl**, v. 10, n. 9-10, p. 910-921, 2016.

KUMAR, V. et al. Purification and characterization of a cysteine dioxygenase from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. **Biochemistry**, v. 22, n. 4, p. 762-8, 1983.

KUROWSKI, R.; OSTAPCHUK, M. Overview of histoplasmosis. **Am Fam Physician**, v. 66, n. 12, p. 2247-52, 2002.

KWON-CHUNG, K.; BENNETT, J. Histoplasmosis. In: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p.464-513.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LAIRD, N. M.; HORVATH, S.; XU, X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. **Genet Epidemiol**, v. 19 Suppl. 1, p. S36-42, 2000.

LARSH, H. The epidemiology of histoplasmosis. In: AL-DOORY, Y. (Ed.). *The Epidemiology of Human: Micotic Diseases*. Illinois: Springfield, 1975. p.52-73.

LARSH, H. W.; BARTELS, P. A. Serology of histoplasmosis. **Mycopathol Mycol Appl**, v. 41, n. 1, p. 115-31, 1970.

LIEDKE, S. C. et al. Characterization of the antifungal functions of a WGA-Fc (IgG2a) fusion protein binding to cell wall chitin oligomers. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 12187, 2017.

LONG, K. H. et al. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. **J Immunol**, v. 170, n. 1, p. 487-94, 2003.

LÓPEZ, C. E. Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Rev Argent Microbiol**, v. 38, n. 4, p. 235-42, 2006.

LUMBSCH, H. T.; HUHDORF, S. M. Whatever happened to the pyrenomycetes and loculoascomycetes? **Mycol Res**, v. 111, n. 9, p. 1064-74, 2007.

LUMBSCH, H. T. et al. Ascus types are phylogenetically misleading in Trapeliaceae and Agyriaceae (Ostropomycetidae, Ascomycota). **Mycol Res**, v. 111, n. Pt 9, p. 1133-41, 2007.

LUO, T. et al. Immunoproteomic Analysis of Antibody Responses to Extracellular Proteins of *Candida albicans* Revealing the Importance of Glycosylation for Antigen Recognition. **J Proteome Res**, v. 15, n. 8, p. 2394-406, 2016.

MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **Contrib Microbiol**, v. 5, p. 201-16, 2000.

MARESCA, B. et al. Role of cysteine in regulating morphogenesis and mitochondrial activity in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 7, p. 4596-600, 1981.

MARTINS, L. M. et al. Immunoproteomics and immunoinformatics analysis of *Cryptococcus gattii*: novel candidate antigens for diagnosis. **Future Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 549-63, 2013.

MAUBON, D.; SIMON, S.; AZNAR, C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 58, n. 4, p. 441-4, 2007.

MEDEIROS, A. I. et al. Differential release of MIP-1alpha and eotaxin during infection of mice by *Histoplasma capsulatum* or inoculation of beta-glucan. **Inflamm Res**, v. 53, n. 8, p. 351-4, 2004.

MONTEOLIVA, L. et al. Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition. **J Proteome Res**, v. 10, n. 2, p. 502-17, 2011.

MOURA, H. et al. Studies on botulinum neurotoxins type/C1 and mosaic/DC using Endopep-MS and proteomics. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 61, n. 3, p. 288-300, 2011.

MUÑOZ-ELÍAS, E. J. et al. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. **Mol Microbiol**, v. 60, n. 5, p. 1109-22, 2006.

MURAD, A. M. et al. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **J Sep Sci**, v. 34, n. 19, p. 2618-30, 2011.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. Medical microbiology. 6. Philadelphia: Elsevier, 2008.

NACHER, M. et al. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients in South America: a neglected killer continues on its rampage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 11, p. e2319, 2013.

NEMECEK, J. C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science**, v. 312, n. 5773, p. 583-8, 2006.

NGUYEN, V. Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 12, p. 4880-5, 2008.

NOSANCHUK, J. D. Protective antibodies and endemic dimorphic fungi. **Curr Mol Med**, v. 5, n. 4, p. 435-42, 2005.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3519-28, 2006.

NOSANCHUK, J. D. et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5124-31, 2002.

NOSANCHUK, J. D. et al. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. **J Clin Invest**, v. 112, n. 8, p. 1164-75, 2003.

ORSBORN, K. I. et al. Protein expression profiling of *Coccidioides posadasii* by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and evaluation of a newly recognized peroxisomal matrix protein as a recombinant vaccine candidate. **Infect Immun**, v. 74, n. 3, p. 1865-72, 2006.

PARENTE, A. F. et al. Proteomic analysis reveals that iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22810, 2011.

PASRICHA, S. et al. Extensive Metabolic Remodeling Differentiates Non-pathogenic and Pathogenic Growth Forms of the Dimorphic Pathogen. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, p. 368, 2017.

PASTORELLI, R. et al. Differential expression profiling of the hepatic proteome in a rat model of dioxin resistance: correlation with genomic and transcriptomic analyses. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 5, p. 882-94, 2006.

PINE, L. Studies on the growth of *Histoplasma capsulatum*. I. Growth of the yeast phase in liquid media. **J Bacteriol**, v. 68, n. 6, p. 671-9, 1954.

PITARCH, A. et al. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 787, n. 1, p. 101-28, 2003.

PIZZINI, C. V. et al. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 6, n. 1, p. 20-3, 1999.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-21, 2009.

QUIST, E. M. et al. Disseminated histoplasmosis with concurrent oral candidiasis in an Eclectus parrot (*Eclectus roratus*). **Avian Pathol**, v. 40, n. 2, p. 207-11, 2011.

RAPPLEYE, C. A.; EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 4, p. 1366-70, 2007.

RAPPLEYE, C. A.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 153-65, 2004.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 281-303, 2006.

REYES-MONTES, M. R. et al. Identification of the source of histoplasmosis infection in two captive maras (*Dolichotis patagonum*) from the same colony by using molecular and immunologic assays. **Rev Argent Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 102-4, 2009.

REZENDE, T. C. et al. A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. **J Proteomics**, v. 75, n. 2, p. 572-87, 2011.

RODRIGUES, A. M. et al. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **J Proteomics**, v. 115, p. 8-22, 2015.

ROSSINI, T.; GOULART, L. Histoplasmosse clássica: revisão. **Rev Bras Anal Clin**, v. 38, n. 4, p. 275-9, 2006.

RUÍZ-HERRERA, J.; OSORIO, E. Isolation and chemical analysis of the cell wall of *Morchella* sp. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 40, n. 1, p. 57-64, 1974.

SALVIN, S. B. Cysteine and related compounds in the growth of the yeast like phase of *Histoplasma capsulatum*. **J Infect Dis**, v. 84, n. 3, p. 275-83, 1949.

SAN-BLAS, G.; CARBONELL, L. M. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeast like and mycelial forms of *Histoplasma farciminosum*. **J Bacteriol**, v. 119, n. 2, p. 602-11, 1974.

SCHEEL, C.; GÓMEZ, B. Diagnostic Methods for Histoplasmosis: Focus on Endemic Countries with Variable Infrastructure Levels. **Curr Trop Med Rep**, v. 1, p. 129-137, 2014.

SEBGHATI, T. S.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1368-72, 2000.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. **Proteomics**, v. 10, n. 7, p. 1444-54, 2010.

SEPÚLVEDA, V. E. et al. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen. **MBio**, v. 8, n. 6, 2017.

SHANER, L.; GIBNEY, P. A.; MORANO, K. A. The Hsp110 protein chaperone Sse1 is required for yeast cell wall integrity and morphogenesis. **Curr Genet**, v. 54, n. 1, p. 1-11, 2008.

SHEN, Q.; RAPPLEYE, C. A. Differentiation of the fungus *Histoplasma capsulatum* into a pathogen of phagocytes. **Curr Opin Microbiol**, v. 40, p. 1-7, 2017.

STAERCK, C. et al. Transcriptional profiling of *Scedosporium apiospermum* enzymatic antioxidant gene battery unravels the involvement of thioredoxin reductases against chemical and phagocytic cells oxidative stress. **Med Mycol**, 2018.

SUBRAMANIAN VIGNESH, K. et al. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor-induced Zn Sequestration Enhances Macrophage Superoxide and Limits Intracellular Pathogen Survival. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 697-710, 2013.

TABORDA, C. P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 331-9, 2008.

TAMAYO, D. et al. Identification and Analysis of the Role of Superoxide Dismutases Isoforms in the Pathogenesis of *Paracoccidioides* spp. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004481, 2016.

TAPLEY, T. L. et al. Structural plasticity of an acid-activated chaperone allows promiscuous substrate binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 14, p. 5557-62, 2009.

TAPLEY, T. L. et al. Protein refolding by pH-triggered chaperone binding and release. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 3, p. 1071-6, 2010.

TAYLOR, M. L.; CHÁVEZ-TAPIA, C. B.; REYES-MONTES, M. R. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. **Fungal Genet Biol**, v. 30, n. 3, p. 207-12, 2000.

TAYLOR, M. L.; GRANADOS, J.; TORIELLO, C. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. **Mycoses**, v. 39, n. 9-10, p. 375-9, 1996.

TEIXEIRA, M. M. et al. Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 6, p. e0004732, 2016.

TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 6, p. 1843-50, 2007.

VAZ, A. F. Análise proteômica comparativa do processo de diferenciação celular do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2014.

WEBER, S. S. et al. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52470, 2012.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

WHEAT, L. J. Laboratory diagnosis of histoplasmosis: update 2000. **Semin Respir Infect**, v. 16, n. 2, p. 131-40, 2001.

WHEAT, L. J. et al. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis, and management. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 25, n. 2, p. 129-44, 2004.

WHEAT, L. J. et al. Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 207-27, 2016.

WHEAT, L. J.; KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 17, n. 1, p. 1-19, 2003.

WILKINS, M. Proteomics data mining. **Expert Rev Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 599-603, 2009.

WINTERS, M. S. et al. *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. **Proteome Sci**, v. 6, p. 36, 2008.

WINTERS, M. S. et al. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. **J Infect Dis**, v. 202, n. 7, p. 1136-45, 2010.

XI, L. et al. Differentially expressed proteins of pathogenic *Penicillium marneffe* in yeast and mycelial phases. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 3, p. 298-304, 2007.

XIE, L. et al. Proteomic analysis of lysine succinylation of the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. **J Proteomics**, v. 154, p. 109-117, 2017.

YOUSEFF, B. H. et al. Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 5, p. e1002713, 2012.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. et al. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 1, n. 4, p. 390-3, 1994.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MUNIZ, M.; WANKE, B. Histoplasmoses. In: COURA, J. (Ed.). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2, 2013. p.1238-49.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; WANKE, B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no Município do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pública**, v. 2, n. 1, p. 42-52, 1986.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. et al. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 67, n. 4, p. 1947-53, 1999.

ZHENG, H. et al. Systematic Analysis of the Lysine Succinylome in *Candida albicans*. **J Proteome Res**, v. 15, n. 10, p. 3793-3801, 2016.

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O DOUTORAMENTO

Artigos publicados

ALMEIDA MA, PIZZINI CV, DAMASCENO LS, MUNIZ MM, ALMEIDA-PAES R, PERALTA RH, PERALTA JM, OLIVEIRA RVC, VIZZONI AG, ANDRADE CLT, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. Validation of western blot for *Histoplasma capsulatum* antibody detection assay. BMC Infect Dis. 2016;16:87.

ALMEIDA-PAES R, ALMEIDA-SILVA F, PINTO GCM, **ALMEIDA MA**, MUNIZ MM, PIZZINI CV, GERFEN GJ, NOSANCHUCK JD, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. L-tyrosine induces the production of a pyomelanin-like pigment by the parasitic yeast-form of *Histoplasma capsulatum*. Med Mycol. 2018;56(4):506-9.

MACEDO PM, ALMEIDA-PAES R, **ALMEIDA MA**, COELHO RA, OLIVEIRA FILHO MA, MEDEIROS DM, GOMES-SILVA A, LIMA JR, DA-CRUZ AM, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM, VALLE ACFD. Fatal septic shock caused by *Paracoccidioides brasiliensis* phylogenetic species S1 in a young immunocompetent patient: a case report. Rev Soc Bras Med Trop. 2018; 51(1):111-114.

MACEDO PM, ALMEIDA-PAES R, **ALMEIDA MA**, COELHO RA, ANDRADE HB, FERREIRA ABTBC, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM, VALLE ACFD. Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* S1 plus HIV co-infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018;113(3):167-172.

Artigo aceito para publicação

ALMEIDA MA, DAMASCENO LS, PIZZINI CV, MUNIZ MM, ALMEIDA-PAES R, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. Role of western blot assay for the diagnosis of Histoplasmosis in AIDS patients from a National Institute of Infectious Diseases in Rio de Janeiro, Brazil. Mycoses. Aceito em dezembro de 2018.

DAMASCENO LS, VITE-GARIN T, RAMÍREZ JA, **ALMEIDA MA**, MUNIZ MM, MESQUITA JRL, LEITÃO TMJS, TAYLOR ML, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. Mixed infection by *Histoplasma capsulatum* isolates with different mating types in

Brazilian AIDS-associated histoplasmosis patients. Rev Inst Med Trop São Paulo. Aceito em dezembro de 2018.

Artigo submetido para publicação

FERREIRA MF, BRITO-SANTOS F, TRILLES L, **ALMEIDA MA**, WANKE B, VELOSO VG, NUNES EP, LAZÉRA MS. Cryptococcal antigenemia prevalence and clinical data in HIV infected patients from the reference center at INI-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Southeast of Brazil. Mycoses. Submetido em novembro de 2018.

DAMASCENO LS, TEIXEIRA MM, BARKER BM, **ALMEIDA MA**, MUNIZ MM, PIZZINI CV, MESQUITA JRL, RODRÍGUEZ-ARELLANES G, RAMÍREZ JA, VITE-GARIN T, LEITÃO TMJS, TAYLOR ML, ALMEIDA-PAES R, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. Histoplasmosis in HIV patients: Novel clinical *Histoplasma capsulatum* genotypes and dual infection by different genotypes. Scientific Reports. Submetido em novembro de 2018.

Artigo em elaboração

ALMEIDA MA, ALMEIDA-SILVA F, GUIMARÃES AJ, ALMEIDA-PAES R, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review.

ALMEIDA MA, BAEZA LC, ALMEIDA-PAES R, BAILÃO AM, BORGES CL, GUIMARÃES AJ, SOARES CMA, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. Comparative proteomics analysis of *Histoplasma capsulatum*.

ALMEIDA MA, GUIMARÃES AJ, ALMEIDA-PAES R, ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM. Identification of antigenic specific proteins the proteome of *Histoplasma capsulatum* yeast phase.

APÊNDICE A – TABELA SUPLEMENTAR 1

Tabela suplementar 1: Proteínas identificadas em células leveduriformes de *Histoplasma capsulatum*

Número de acesso ^a	Descrição da proteína ^b	Score	Quantificação (fmol)	Repetição
HCAG_05409	2,3 biphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase	492,3557	45,6814	3
HCAG_09984	2 isopropylmalate synthase	809,6718	41,80215	2
HCAG_05094	2 methylcitrate desidratase	8720,755	189,0741	3
HCAG_05090	2 methylcitrate synthase	4578,922	221,3285	3
HCAG_02901	26S protease regulatory subunit	360,6088	22,3046	2
HCAG_07682	26S protease regulatory subunit	402,9584	27,39077	3
HCAG_04181	26S protease regulatory subunit	273,1039	8,113267	3
HCAG_00039	26S protease regulatory subunit	1058,045	20,39897	3
HCAG_00069	26S protease regulatory subunit	1344,447	26,74167	3
HCAG_04173	3 family protein	36641,64	754,6643	3
HCAG_01093	3 hydroxyisobutyrate desidrogenase	1949,321	54,67277	3
HCAG_02524	3 hydroxyisobutyryl coa hidrolase	2429,474	33,63607	3
HCAG_07104	3 isopropylmalate desidratase	2260,901	101,7379	3
HCAG_01596	3 ketoacyl coa thiolase peroxisomal A	4010,7	86,12136	3
HCAG_07773	40S ribosomal protein S11	2419,144	134,811	3
HCAG_06308	40S ribosomal protein S12	3881,94	108,6785	3
HCAG_08075	40S ribosomal protein S14	12754,87	190,4916	3
HCAG_02704	40S ribosomal protein S15	14108,52	169,8381	3
HCAG_08092	40S ribosomal protein S17	16364,66	276,7947	3
HCAG_08667	40S ribosomal protein S18	10030,5	176,5375	3
HCAG_02272	40S ribosomal protein S22	3728,225	222,6127	3
HCAG_04418	40S ribosomal protein S24	3529,514	104,6506	3
HCAG_02186	40S ribosomal protein S25	9014,106	187,2743	3

HCAG_05528	40s ribosomal protein s26	14543,2	180,2246	3
HCAG_01228	40S ribosomal protein S27	9230,458	210,9722	3
HCAG_00214	40S ribosomal protein S3	13502,29	330,7447	3
HCAG_06914	40S ribosomal protein S3A	8963,706	268,4091	3
HCAG_02430	40S ribosomal protein S5 A	9329,065	270,826	3
HCAG_06613	40S ribosomal protein S7e	27823,93	288,2886	3
HCAG_07249	40S ribosomal protein S9	9602,348	271,8529	3
HCAG_01353	50S ribosomal protein L12	1917,47	40,2109	3
HCAG_05884	6 phosphogluconate dehydrogenase	8023,932	134,2552	3
HCAG_02703	60S acidic ribosomal protein P2	37524,69	636,746	3
HCAG_04231	60S ribosomal protein	5466,812	184,5962	3
HCAG_00468	60S ribosomal protein	11604,62	332,2704	3
HCAG_01850	60S ribosomal protein L1	4310,316	202,4637	3
HCAG_04788	60S ribosomal protein L12	10017,52	96,46805	2
HCAG_07708	60S ribosomal protein L13	5848,991	159,9491	3
HCAG_03611	60S ribosomal protein L15	3859,495	180,8195	3
HCAG_00164	60S ribosomal protein L16	3658,679	115,9205	3
HCAG_02327	60S ribosomal protein L17	4335,706	131,8487	3
HCAG_03593	60S ribosomal protein L18A	6184,298	211,525	3
HCAG_07408	60S ribosomal protein L19	630,1314	150,2913	3
HCAG_08515	60S ribosomal protein L2	2675,752	190,8464	3
HCAG_07248	60s ribosomal protein l21	9046,552	114,6985	3
HCAG_04519	60S ribosomal protein L23	4206,323	146,5691	3
HCAG_03167	60S ribosomal protein L24	3181,524	173,5972	3
HCAG_08351	60S ribosomal protein	3132,571	95,03205	2
HCAG_00055	60S ribosomal protein L27 A	9591,356	190,1584	3
HCAG_03923	60S ribosomal protein L3	2166,346	190,2071	3
HCAG_04561	60S ribosomal protein L34	3276,423	138,4565	2

HCAG_03415	60S ribosomal protein L35	1572,399	167,4207	3
HCAG_04185	60S ribosomal protein L36	5704,479	100,41	2
HCAG_06534	60S ribosomal protein L43	2178,935	106,1251	2
HCAG_07397	60S ribosomal protein L44	1394,489	51,6387	2
HCAG_08444	60S ribosomal protein L5	20223,5	346,551	3
HCAG_01793	60S ribosomal protein L6	6888,758	186,8992	3
HCAG_08706	60S ribosomal protein L7	13876,5	296,9897	3
HCAG_01606	Acetate coa ligase	629,007	42,84247	3
HCAG_08039	Acetoacetyl coa reductase	436,767	32,5138	2
HCAG_09712	Acetoacetyl coa synthase	438,9954	42,08695	2
HCAG_06005	Acetolactate synthase	1168,337	64,7911	3
HCAG_00814	Acetyl coa acetyltransferase	2630,681	70,0264	3
HCAG_08621	Acetyl coa acetyltransferase	1335,855	43,06653	3
HCAG_03801	Acetylorntithine aminotransferase	703,3643	16,45323	3
HCAG_05266	Aconitase	4464,713	211,8914	3
HCAG_05531	Aconitate hydratase	252,6619	14,73045	2
HCAG_08210	Actin	14794,47	561,8375	3
HCAG_09978	Acyl coa dehydrogenase	1069,405	74,9761	3
HCAG_09977	Acyl coa dehydrogenase	2132,312	40,54766	3
HCAG_08512	Adenosine kinase	1205,733	51,25657	3
HCAG_10265	Adenosylhomocysteinase	13278,38	150,7717	3
HCAG_06743	Adenylosuccinate synthetase adb	1471,27	43,9758	3
HCAG_06283	Adp ATP carrier protein	1485,426	79,02267	3
HCAG_01847	ADP ribosylation factor	9345,842	212,8537	3
HCAG_01583	Aha1 domain family	4458,064	137,6216	3
HCAG_05679	Alanine transaminase	847,1642	53,8278	3
HCAG_08561	Alcohol dehydrogenase	9589,18	315,7762	3
HCAG_07199	Aldehyde reductase I	3414,787	60,97943	3

HCAG_03188	Allergen Asp F3	4953,224	87,64917	3
HCAG_01535	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase	730,2918	76,87164	3
HCAG_03721	Alternative oxidase	450,1994	27,2548	3
HCAG_06935	Aminopeptidase	736,5375	59,70234	3
HCAG_07083	Aminopeptidase	874,8786	58,72897	3
HCAG_08796	Ankyrin repeat protein	807,6809	31,48707	3
HCAG_05224	Anthranilate synthase component I	2180,698	82,39523	3
HCAG_00748	Anthranilate synthase multifunctional enzyme	610,8798	42,9185	2
HCAG_00035	Arginase	3692,53	98,96786	3
HCAG_07805	Argininosuccinate lyase	588,2655	33,0729	3
HCAG_06683	Argininosuccinate synthetase	3385,939	111,2182	3
HCAG_03866	Arginyl trna synthetase	465,6223	22,14395	2
HCAG_06610	Arp2 3 complex subunit	2635,247	27,0049	3
HCAG_03174	Arp2 3 complex subunit	1452,443	40,97177	3
HCAG_04706	ARP2 3 complex subunit	1985,061	38,9795	3
HCAG_00848	Arp2 3 complex subunit	862,9192	57,70245	2
HCAG_00048	Arsenical pump driving atpase	1086,852	42,48613	3
HCAG_08678	Aspartate aminotransferase	7898,256	209,2698	3
HCAG_06102	Aspartate aminotransferase	2343,15	168,5527	3
HCAG_10740	Aspartyl trna synthetase	948,9213	40,8965	3
HCAG_04933	ATP citrate lyase	2139,029	126,857	3
HCAG_04934	ATP citrate synthase subunit 1	2099,132	125,1271	3
HCAG_04273	ATP dependent RNA helicase eif4a	13675,61	169,9696	3
HCAG_00406	ATP dependent RNA helicase FAL1	1752,275	24,93793	3
HCAG_05061	ATP dependent RNA helicase SUB2	1386,906	69,001	2
HCAG_06360	ATP phosphoribosyltransferase	1510,121	23,1415	3
HCAG_05098	ATP synthase D chain	1066,909	32,02633	3
HCAG_04799	ATP synthase gamma chain	4248,335	88,31953	3

HCAG_02813	ATP synthase subunit alpha	11027,9	291,3853	3
HCAG_07132	BAR domain containing protein	2296,888	86,57837	3
HCAG_04224	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE16	3788,508	104,0566	3
HCAG_08945	Branched chain amino acid aminotransferase	2292,734	71,38987	3
HCAG_04357	C 1 tetrahydrofolate synthase	760,8495	47,88474	3
HCAG_00633	Calcineurin catalytic subunit cnaa	694,1954	54,5769	2
HCAG_01325	Calmodulin	2490,928	96,09657	3
HCAG_05488	Camp dependent protein kinase regulatory subunit pkar	456,1616	34,21005	2
HCAG_06885	Cap binding protein	979,2518	33,30407	3
HCAG_02700	Carbamoyl phosphate synthase	459,5179	33,41815	2
HCAG_03790	Carnitine acetyl transferase	1091,015	76,2204	3
HCAG_08064	Catalase B	4067,683	230,0302	3
HCAG_08345	Cell cycle control protein	14299,69	330,5042	3
HCAG_02452	Cell division cycle protein	7047,104	209,7992	3
HCAG_00290	Chorismate mutase	1438,515	57,32437	3
HCAG_00486	Chromatin assembly factor 1 subunit C	423,9109	57,6112	2
HCAG_06981	Citrate synthase	8841,988	162,3114	3
HCAG_04225	Clathrin heavy chain	1076,35	46,22586	3
HCAG_00337	Cleavage and polyadenylation specificity factor	1945,841	63,4969	3
HCAG_05565	Cobalamin independent methionine synthase meth D	12005,81	288,699	3
HCAG_06960	Cofilin	3211,355	64,28446	3
HCAG_02022	Conserved hypothetical protein	6511,567	82,4698	2
HCAG_08732	Conserved hypothetical protein	12375,45	273,9344	3
HCAG_04397	Conserved hypothetical protein	21679,95	246,0669	3
HCAG_05185	Conserved hypothetical protein	2402,85	35,173	3
HCAG_05552	Conserved hypothetical protein	2736,279	30,4943	3
HCAG_02975	Conserved hypothetical protein	5327,349	76,036	2
HCAG_06099	Conserved hypothetical protein	2587,254	45,5759	2

HCAG_06375	Conserved hypothetical protein	5863,75	117,6953	3
HCAG_04326	Conserved hypothetical protein	1426,516	20,71615	2
HCAG_04232	Conserved hypothetical protein	661,942	23,45335	2
HCAG_04776	Conserved hypothetical protein	7365,263	70,3944	3
HCAG_06999	Conserved hypothetical protein	1586,429	42,0455	3
HCAG_00803	Conserved hypothetical protein	1014,806	48,5732	2
HCAG_07305	Conserved hypothetical protein	1812,133	81,92648	3
HCAG_03758	Conserved hypothetical protein	3542,272	72,69483	3
HCAG_05402	Conserved hypothetical protein	782,006	20,99755	2
HCAG_07444	Conserved hypothetical protein	796,3632	51,81615	2
HCAG_07936	Conserved hypothetical protein	402,9731	17,72575	2
HCAG_04294	Conserved hypothetical protein	1635,122	40,5165	3
HCAG_02919	Conserved hypothetical protein	1475,796	38,66193	3
HCAG_03731	Conserved hypothetical protein	486,2803	21,9114	2
HCAG_01332	Conserved hypothetical protein	865,2297	63,6858	3
HCAG_07970	Conserved hypothetical protein	749,9848	196,3398	2
HCAG_08367	Conserved hypothetical protein	5687,869	200,473	3
HCAG_11293	Conserved hypothetical protein	2968,91	137,4345	3
HCAG_06889	Conserved hypothetical protein	860,8	92,82117	3
HCAG_03851	Conserved hypothetical protein	641,6033	45,97615	2
HCAG_08192	Conserved hypothetical protein	1165,078	30,16707	3
HCAG_00005	Conserved hypothetical protein	1334,497	49,9807	3
HCAG_00272	Conserved hypothetical protein	537,689	27,01877	3
HCAG_08411	Conserved hypothetical protein	712,8118	39,27887	3
HCAG_01854	Conserved hypothetical protein	1276,919	33,41745	2
HCAG_01835	CORD and CS domain containing protein	1721,563	67,8534	3
HCAG_04015	Coronin like protein crn1	788,0389	39,12313	3
HCAG_06523	Curved DNA binding protein	743,7593	60,45393	3

HCAG_07434	Cystathionine beta synthase	872,2492	43,00005	2
HCAG_00616	Cysteinyln trna synthetase	544,9019	31,11764	3
HCAG_07539	Cytochrome b2	516,258	29,4317	3
HCAG_00437	Cytochrome c oxidase chain VI	2317,187	53,29557	3
HCAG_09319	Cytochrome c peroxidase	9986,348	161,9501	3
HCAG_07098	Cytochrome c peroxidase	2578,487	157,7366	3
HCAG_03694	Cytosolic large ribosomal subunit protein L30	17386,25	209,9541	3
HCAG_03111	D 3 phosphoglycerate dehydrogenase	585,0975	44,67647	3
HCAG_09000	Delta 1 pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase prnc	638,442	38,0306	2
HCAG_03972	Dihydrolipoamide acetyltransferase component	2097,536	109,8462	3
HCAG_08825	Dihydrolipoamide dehydrogenase	7554,961	182,2048	3
HCAG_03522	Dihydrolipoamide succinyltransferase	1227,547	86,82027	3
HCAG_05596	Diphosphomevalonate decarboxylase	1528,222	36,60697	3
HCAG_04527	DNA damage checkpoint protein rad24	23285,01	336,7387	3
HCAG_00176	Dnaj and TPR domain containing protein	382,6965	25,3293	2
HCAG_05805	DNAK molecular chaperone bipa	8733,758	496,3055	3
HCAG_02296	DUF1014 domain containing protein	814,4769	36,02855	2
HCAG_07572	DUF427 domain containing protein	1445,851	106,7784	2
HCAG_07065	DUF757 domain containing protein	3106,05	39,91034	3
HCAG_06605	EB1 protein	532,5627	10,55585	2
HCAG_03847	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	2845,263	99,4398	3
HCAG_02931	Electron transfer flavoprotein beta subunit	1222,015	46,4588	2
HCAG_01917	Elicitor protein	4218,983	188,1623	3
HCAG_01784	Elongation factor 1 beta	13244,9	335,0582	3
HCAG_08236	Elongation factor 1 gamma	8342,179	186,442	3
HCAG_05988	Elongation factor 2	9235,812	288,1314	3
HCAG_03444	Elongation factor Tu	4772,664	123,0337	3
HCAG_08058	Enoyl coa hydratase isomerase family protein	2558,898	79,85535	2

HCAG_04675	Esterase D	958,4604	51,2963	2
HCAG_04139	Eukaryotic phosphomannomutase	2159,559	62,71287	3
HCAG_04206	Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit	579,6935	70,98791	3
HCAG_08183	Eukaryotic translation initiation factor 3	935,377	26,77673	3
HCAG_08080	Eukaryotic translation initiation factor 3	915,1443	36,842	3
HCAG_03286	Eukaryotic translation initiation factor 3	839,155	60,46716	3
HCAG_08704	Eukaryotic translation initiation factor 3	490,8954	54,30233	3
HCAG_04356	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2	1470,13	39,9899	2
HCAG_03353	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3	607,9618	39,7938	2
HCAG_00044	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6	497,7496	34,3335	2
HCAG_01956	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit eifcf	2380,531	33,0398	2
HCAG_00413	Farnesyl pyrophosphate synthetase	3870,777	140,5544	3
HCAG_07636	Fatty acid synthase alpha subunit fasa	531,4349	59,70647	3
HCAG_07637	Fatty acid synthase beta subunit dehydratase	661,2315	79,15063	3
HCAG_07461	Fimbrin	1394,655	41,03476	3
HCAG_03748	FK506 binding protein 1A	851,8973	52,15435	2
HCAG_07972	FKBP type peptidyl prolyl isomerase putative	3158,454	80,91674	3
HCAG_00010	Fructose 1 6 biphosphate aldolase	17987,7	493,8215	3
HCAG_03322	Fructose 1 6 bisphosphatase	6459,385	221,4372	3
HCAG_08493	Fumarate hydratase class II	12334,48	280,1246	3
HCAG_03323	Fumarate reductase flavoprotein subunit	3147,101	125,6672	3
HCAG_07031	G protein complex beta subunit cpcb	12519,53	323,788	3
HCAG_08290	Gamma butyrobetaine dioxygenase	413,738	66,9063	3
HCAG_07464	Gamma glutamyl phosphate reductase	2626,118	54,23727	3
HCAG_05711	GDP mannose pyrophosphorylase A	2208,004	57,9971	3
HCAG_04088	Glucosamine fructose 6 phosphate aminotransferase	4868,685	196,312	3
HCAG_08202	Glucose 6 phosphate isomerase	2576,587	109,3278	3
HCAG_03543	Glutamate carboxypeptidase	1578,964	58,8445	3

HCAG_05651	Glutamate dehydrogenase	1054,277	56,1146	3
HCAG_09757	Glutamate synthase	672,6308	52,95097	3
HCAG_05070	Glutamine synthetase	546,2783	27,6783	2
HCAG_07028	Glutamine synthetase partial	1904,71	94,95274	3
HCAG_08250	Glutaminyl trna synthetase	928,2912	30,02714	3
HCAG_04910	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	61046,14	1224,222	3
HCAG_03267	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase	999,9523	57,46107	3
HCAG_07571	Glycine dehydrogenase	1310,57	52,3631	3
HCAG_02914	Glycine rich protein	12427,35	339,1012	3
HCAG_03017	Glycyl trna synthetase	529,5927	52,32585	2
HCAG_04496	GMP synthase putative	1505,514	44,72493	3
HCAG_05187	GTP binding nuclear protein GSP1 Ran	17182,13	353,1788	3
HCAG_06262	GTP binding protein	756,6933	22,661	2
HCAG_06941	GTP binding protein	2024,781	56,8438	3
HCAG_07659	GTP binding protein	1048,013	13,4244	3
HCAG_01447	GTP binding protein	1126,126	54,9423	3
HCAG_02007	Guanylate kinase	844,4261	41,26255	2
HCAG_06977	H atpase	415,0656	26,9263	3
HCAG_08408	HAD superfamily hydrolase	12974,51	428,0258	3
HCAG_04111	Heat shock protein 30	3264,537	302,5589	3
HCAG_04686	Heat shock protein	44992,54	1193,477	3
HCAG_00806	Heat shock protein SSB1	3801,616	122,2351	3
HCAG_08176	Heat shock protein SSC1	17075,71	378,8485	3
HCAG_04471	Heat shock protein STI1	5382,831	171,4749	3
HCAG_01131	Het c2 protein	1105,472	39,93617	3
HCAG_02357	Histidinol dehydrogenase	659,5228	61,03953	3
HCAG_08774	Histone chaperone asf1	1486,036	53,0967	3
HCAG_03524	Histone H2A	2912,565	188,7169	3

HCAG_04914	Histone H2A	2026,588	19,91765	2
HCAG_03525	Histone H2b	9974,005	270,4625	3
HCAG_03885	Histone H4	4158,552	116,1169	3
HCAG_00066	HNRNP arginine N methyltransferase	605,7864	19,72835	2
HCAG_06098	Homocitrate synthase	2684,061	80,16656	3
HCAG_00014	Homoserine dehydrogenase	794,0332	58,155	2
HCAG_04943	Hsp10 like protein	24012,22	568,8479	3
HCAG_06961	Hsp60 like protein	41212,29	828,719	3
HCAG_01398	Hsp70 like protein	56129,46	1049,763	3
HCAG_00783	Hsp88 like protein	8559,245	298,9356	3
HCAG_05533	Hypothetical protein	24388,81	337,0344	3
HCAG_07506	Hypothetical protein	24090,81	157,9821	3
HCAG_06895	Hypothetical protein	843,4086	80,78505	2
HCAG_06361	Hypothetical protein	30146,46	204,525	3
HCAG_04824	Hypothetical protein	2565,487	31,19303	3
HCAG_06110	Immunogenic protein	8589,824	326,8529	3
HCAG_04307	Inorganic pyrophosphatase	1248,939	64,13903	3
HCAG_06694	Isoleucyl trna synthetase cytoplasmic	716,8983	55,70977	3
HCAG_08890	Ketol acid reductoisomerase	14108,47	519,1456	3
HCAG_06296	Ketoreductase	429,1789	38,9558	2
HCAG_06295	KH domain RNA binding protein	4513,452	67,63947	3
HCAG_03732	KH domain RNA binding protein	652,4767	37,76755	2
HCAG_05229	Leucyl trna synthetase	445,6577	41,83935	2
HCAG_07440	Leukotriene A4 hydrolase	548,4642	30,27205	2
HCAG_01128	LRP16 family protein	537,8452	28,0498	2
HCAG_05713	Lysyl trna synthetase	1356,735	71,04867	3
HCAG_06901	Malate dehydrogenase	16307,27	213,0977	3
HCAG_03969	Malate dehydrogenase	37909,94	509,3897	3

HCAG_05084	Malate synthase	461,0543	39,04725	2
HCAG_03448	Manganese superoxide dismutase	7937,047	307,6306	3
HCAG_08720	Mannitol 1 phosphate dehydrogenase	8214,13	249,4394	3
HCAG_01552	Mannose 1 phosphate guanyltransferase	1321,119	63,20145	2
HCAG_08436	Mannose 6 phosphate isomerase	926,756	30,90103	3
HCAG_06059	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	1703,577	132,7407	3
HCAG_05584	Mitochondrial acetolactate synthase small subunit	847,1709	38,43224	3
HCAG_06944	Mitochondrial ATP synthase	14512,35	259,4264	3
HCAG_00973	Mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit F	2760,902	43,1316	3
HCAG_02342	Mitochondrial processing peptidase subunit	627,1706	62,89457	3
HCAG_04853	Mitochondrial protein import protein MAS5	2242,823	34,81233	3
HCAG_00893	Molybdopterin binding domain containing protein	856,8976	37,4294	2
HCAG_08291	Monothiol glutaredoxin 4	494,8101	23,3259	2
HCAG_04339	Multi bridging factor 1 putative	3816,756	42,63723	3
HCAG_00064	N acetylglucosamine phosphate mutase	3589,48	92,26431	3
HCAG_04093	NAD isocitrate dehydrogenase subunit I	3115,712	44,80767	3
HCAG_03650	NAD specific glutamate dehydrogenase	702,092	95,95243	3
HCAG_05099	Nascent polypeptide associated complex subunit alpha	8742,293	230,9036	3
HCAG_05051	Nascent polypeptide associated complex subunit beta	11732,94	114,9328	3
HCAG_03497	Nicotinate nucleotide pyrophosphorylase	4568,414	122,3166	3
HCAG_09244	Nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA binding protein pub1	1824,574	52,68423	3
HCAG_02807	Nucleic acid binding protein	802,1064	46,19006	3
HCAG_00544	Nucleoside diphosphate kinase	10785	238,5037	3
HCAG_03106	Nucleosome assembly protein	2964,14	122,8346	3
HCAG_00018	Nucleosome binding protein	1014,286	69,39923	3
HCAG_00907	NUDIX hydrolase	1056,262	34,88947	3
HCAG_07004	O acetylhomoserine	578,2699	19,93255	2

HCAG_02754	Oligopeptidase family protein	934,8282	45,3226	2
HCAG_08190	Oxidoreductase 2 nitropropane dioxygenase	998,795	31,17535	2
HCAG_00889	Oxidoreductase	2357,371	50,3971	2
HCAG_08156	Oxidoreductase	747,5274	15,92415	2
HCAG_06409	PCI domain containing protein	656,4379	50,5613	2
HCAG_04544	Peptide methionine sulfoxide reductase	1278,386	82,35105	2
HCAG_07345	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	2320,891	124,7127	3
HCAG_08833	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	22116,2	489,2655	3
HCAG_04215	Peptidyl prolyl cis trans isomerase B	2465,546	60,22563	3
HCAG_04485	Peptidylprolyl isomerase	17467,85	852,0681	3
HCAG_04358	Peroxisomal NADP dependent isocitrate dehydrogenase	783,0504	38,19657	3
HCAG_06371	Phenylacetyl coa ligase	426,9908	12,5269	2
HCAG_04499	Phenylalanyl trna synthetase	681,1558	26,26685	2
HCAG_00215	Phenylalanyl trna synthetase	546,4713	39,0176	2
HCAG_03270	Phospho 2 dehydro 3 deoxyheptonate aldolase	1155,334	46,3055	2
HCAG_05681	Phosphoenolpyruvate carboxykinase acuf	2235,247	161,563	3
HCAG_07552	Phosphofructokinase	611,8942	31,87707	3
HCAG_08808	Phosphoglucomutase	1855,729	102,0644	3
HCAG_03385	Phosphoglycerate kinase	12423,89	365,3285	3
HCAG_03809	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	432,9993	14,89755	2
HCAG_06026	Polyadenylate binding protein	2824,612	115,6125	3
HCAG_11185	Pre mra processing protein	378,269	17,36665	2
HCAG_08343	Predicted protein	5790,637	66,44477	3
HCAG_10780	Predicted protein	7184,29	99,97333	3
HCAG_01399	Predicted protein	1456,296	95,82465	2
HCAG_10781	Predicted protein	2243,416	90,98335	2
HCAG_06996	Processing enhancing protein	1129,767	74,94576	3
HCAG_08950	Progesterone binding protein	1655,529	61,9584	2

HCAG_04835	Proliferating cell nuclear antigen	9254,571	294,8607	3
HCAG_07283	Prolyl trna synthetase	1130,52	60,4771	3
HCAG_04190	Proteasome component	2027,552	51,2532	2
HCAG_04101	Proteasome component	3194,46	77,30953	3
HCAG_00347	Proteasome component	3650,723	65,82407	3
HCAG_04090	Proteasome component	424,4596	43,82935	2
HCAG_03939	Proteasome component	1305,804	56,22657	3
HCAG_05910	Proteasome component	718,4679	37,51605	2
HCAG_00053	Proteasome subunit alpha	1034,737	59,99005	2
HCAG_03630	Proteindisulfidisomerase	10252,34	477,6328	3
HCAG_08383	Psi protein	884,1674	24,71737	3
HCAG_02994	Pyridoxine biosynthesis protein pyroa validated	8497,033	129,6322	3
HCAG_04227	Pyruvate carboxylase	1902,689	80,9469	3
HCAG_08778	Pyruvate decarboxylase	1304,702	77,70216	3
HCAG_01360	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	2457,061	106,0257	3
HCAG_07619	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	6548,242	121,4311	3
HCAG_07781	Pyruvate kinase	3530,522	71,90674	3
HCAG_02612	Ran specific gtpase activating protein	3245,281	115,1822	3
HCAG_05560	Rho gtpase	670,144	21,85075	2
HCAG_04939	Ribose 5 phosphate isomerase A	1260,122	25,7107	2
HCAG_03695	Ribosomal L10 protein	8968,191	241,6503	3
HCAG_03504	Ribosomal protein L22	6314,293	163,6783	3
HCAG_04987	Ribosomal protein L22e	5621,855	205,9209	3
HCAG_03055	Ribosomal protein L23a	2837,255	96,8363	3
HCAG_05192	Ribosomal protein L31e	5415,667	164,4855	3
HCAG_06425	Ribosomal protein L32	10957,93	247,8808	3
HCAG_05221	Ribosomal protein L7a	11324,91	257,9532	3
HCAG_04856	Ribosomal protein P0	7256,87	229,6384	3

HCAG_04662	Ribosomal protein S13	8840,399	204,3448	3
HCAG_04575	Ribosomal protein S16	11695,7	229,2052	3
HCAG_08821	Ribosomal protein S20	7590,177	185,2737	3
HCAG_04498	Ribosomal protein S21e	6717,14	225,7652	3
HCAG_01947	Ribosomal protein S23	2556,498	109,1607	3
HCAG_07237	Ribosomal protein S4	7116,837	291,4173	3
HCAG_07961	Ribosomal protein S5	9939,736	278,6216	3
HCAG_01666	Ribosomal protein S6	3579,4	111,0932	3
HCAG_08073	Ribosomal protein S9	12215,21	196,0245	3
HCAG_08342	RNA binding domain containing protein	643,9538	53,3616	2
HCAG_04410	RNA binding protein a	3201,677	131,2424	3
HCAG_04664	RNA recognition domain containing protein family protein	685,8578	80,6694	2
HCAG_00597	Rnase III domain containing protein	497,9128	18,30715	2
HCAG_05306	RNP domain containing protein	2965,543	109,1367	3
HCAG_07930	RPEL repeat protein	2199,187	66,3206	2
HCAG_02082	Ruvb like helicase	443,3555	17,0074	2
HCAG_03428	S adenosylmethionine synthetase	3760,825	105,5239	3
HCAG_01145	Saccharopine dehydrogenase	1205,061	50,8569	3
HCAG_01575	Saccharopine reductase	2364,546	89,05029	3
HCAG_05465	Sec14 cytosolic factor	580,8625	53,7352	3
HCAG_07830	Secretory pathway gdp dissociation inhibitor	2641,345	94,14173	3
HCAG_00717	Septin 1	2141,66	78,24886	3
HCAG_00459	Septin 2	849,1599	59,23857	3
HCAG_02006	Septin 3	1173,765	60,53613	3
HCAG_03836	Septin	1483,816	55,62654	3
HCAG_05787	Ser Thr protein phosphatase	861,5215	54,8059	3
HCAG_05408	Serine hydroxymethyltransferase	4116,238	86,99223	3
HCAG_07418	Serine hydroxymethyltransferase	2603,516	139,9004	3

HCAG_08377	Serine threonine phosphatase	754,6139	41,1204	2
HCAG_03112	Seryl trna synthetase	750,4748	49,58113	3
HCAG_05071	Short chain dehydrogenase	3996,884	91,6941	3
HCAG_04840	Small COPII coat gtpase sar1	2362,336	50,18705	2
HCAG_03703	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	871,0995	65,3369	2
HCAG_05252	Snare sec24	456,5576	26,563	2
HCAG_04999	Spermidine synthase	5750,292	223,8345	3
HCAG_03646	Stress protein p66	681,952	38,275	3
HCAG_03348	Stress responsive A B barrel domain containing protein	595,9839	20,58975	2
HCAG_10301	Suaprga1	2760,1	75,11964	3
HCAG_06317	Succinate dehydrogenase	1476,041	66,64664	3
HCAG_03263	Succinate dehydrogenase iron sulfur protein	491,2531	63,9407	2
HCAG_08548	Succinyl coa ligase alpha chain	3350,317	56,04593	3
HCAG_07697	Succinyl coa ligase beta chain	3804,913	83,8985	3
HCAG_03008	Sulfur metabolite repression control protein	13253,11	101,0936	3
HCAG_05697	T complex protein 1 epsilon subunit	1530,83	50,40176	3
HCAG_03305	T complex protein 1 subunit beta	1074,614	45,73463	3
HCAG_06315	T complex protein 1 subunit delta	1221,563	45,73345	2
HCAG_05525	T complex protein 1 subunit eta	669,0792	25,61325	2
HCAG_06628	T complex protein	1221,959	44,8042	2
HCAG_07282	T complex protein	724,0911	36,38823	3
HCAG_02143	TCTP family protein	10430,09	181,3029	3
HCAG_06210	Thiol specific antioxidant	25448,88	350,1167	3
HCAG_00878	Thioredoxin domain containing protein	32294,1	216,23	3
HCAG_07096	Thioredoxin domain containing protein	1237,599	29,8413	2
HCAG_07622	Trans 2 enoyl coa reductase	895,5127	10,68463	3
HCAG_00638	Transaldolase	1522,537	134,8891	3
HCAG_02611	Transcription initiation factor TFIID subunit 14	1231,008	56,56213	3

HCAG_05000	Transketolase tkta	2617,731	92,5933	3
HCAG_08798	Translation elongation factor 1 alpha	20291,22	1078,696	3
HCAG_01178	Translation initiation factor 3	5862,111	43,7767	3
HCAG_06021	Translation initiation factor eif 5A putative	1865,138	80,9669	3
HCAG_00267	Translation initiation factor eif3	539,4661	25,33065	2
HCAG_03569	Translation initiation factor eif3a	827,1584	59,45277	3
HCAG_02511	Triosephosphate isomerase	13003,76	275,6922	3
HCAG_01469	Trna ligase	210,0928	0	2
HCAG_05882	Tryptophanyl trna synthetase	1006,899	38,7007	3
HCAG_02068	Tubulin alpha 1 subunit	1251,869	27,1183	2
HCAG_01781	Tubulin beta chain	1742,919	83,145	3
HCAG_08288	Tubulin subunit alpha 2	3343,532	83,12547	3
HCAG_06019	Ubiquitin	15953,08	0	2
HCAG_06566	Ubiquitin fusion protein	15773,92	628,3005	3
HCAG_09628	Ubiquitin activating enzyme E1	1635,299	60,11043	3
HCAG_01770	Ubiquitin like modifier SUMO	1110,976	97,10547	3
HCAG_06641	UDP galactopyranose mutase	1034,324	88,43106	3
HCAG_09614	UDP glucose 4 epimerase	670,2289	37,5002	3
HCAG_09613	UDP glucose 4 epimerase Gal10	576,424	47,69055	2
HCAG_04416	UDP N acetylglucosamine pyrophosphorylase	4410,609	101,0834	3
HCAG_00404	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	1729,485	71,71136	3
HCAG_05951	Vacuolar ATP synthase subunit B	543,7919	37,8907	2
HCAG_06619	Vacuolar sorting associated protein	1031,433	25,4114	2
HCAG_10092	Valyl trna synthetase	444,0311	35,13225	2
HCAG_07700	Xanthine phosphoribosyltransferase	2093,559	38,55233	3
HCAG_07567	Zuotin	661,366	28,43987	3

^a Identificação de proteínas no banco de dados do genoma de *Histoplasma* usando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, Reino Unido) (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html).

^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

APÊNDICE B – TABELA SUPLEMENTAR 2

Tabela suplementar 2: Proteínas identificadas em micélio de *Histoplasma capsulatum*

Número de acesso ^a	Descrição da proteína ^b	Score	Quantificação (fmol)	Repetição
HCAG_05409	2,3 biphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase	505,2018	51,13775	2
HCAG_05094	2 methylcitrate desidratase	14535,38	329,3534	3
HCAG_05090	2 methylcitrate synthase	16035,06	620,6811	3
HCAG_05761	2 oxoisovalerate desidrogenase alpha subunit	1112,957	69,5762	2
HCAG_00039	26S protease regulatory subunit	521,78	40,28955	2
HCAG_04173	3 family protein	10359,37	313,6312	3
HCAG_07725	3 hydroxybutyryl coa desidrogenase	1796,042	69,13264	2
HCAG_01093	3 hydroxyisobutyrate desidrogenase	1743,357	38,8947	3
HCAG_07104	3 isopropylmalate desidratase	982,076	71,54304	3
HCAG_01596	3 ketoacyl coa thiolase peroxisomal A	5890,138	140,9069	3
HCAG_00678	3 methylcrotonyl coa carboxylase biotin containing subunit	1005,831	101,0034	3
HCAG_08375	4 aminobutyrate aminotransferase	2586,583	130,5627	3
HCAG_07773	40S ribosomal protein S11	2268,264	167,6053	3
HCAG_06308	40S ribosomal protein S12	3153,335	101,314	3
HCAG_08075	40S ribosomal protein S14	6408,525	199,9799	3
HCAG_02704	40S ribosomal protein S15	7132,072	126,9721	3
HCAG_08092	40S ribosomal protein S17	11788,51	279,7606	3
HCAG_08667	40S ribosomal protein S18	4736,461	171,4727	3
HCAG_02272	40S ribosomal protein S22	1703,227	172,4262	3
HCAG_02186	40S ribosomal protein S25	8460,757	164,6864	2
HCAG_05528	40s ribosomal protein s26	12441,03	114,4841	3
HCAG_01228	40S ribosomal protein S27	10055,24	207,1882	3
HCAG_00214	40S ribosomal protein S3	12263,16	342,8216	3
HCAG_06914	40S ribosomal protein S3A	6564,305	211,6782	3

HCAG_02430	40S ribosomal protein S5 A	7882,723	285,1515	3
HCAG_06613	40S ribosomal protein S7e	21835,03	283,8467	3
HCAG_10915	40S ribosomal protein S8e	377,9174	101,1142	2
HCAG_07249	40S ribosomal protein S9	10628,59	273,1545	3
HCAG_05363	5 oxoprolinase	1199,545	59,84616	3
HCAG_04089	6,7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase	450,5972	10,8939	2
HCAG_05884	6 phosphogluconate dehydrogenase	13980,23	256,0589	3
HCAG_04762	6 phosphogluconolactonase	639,3469	45,2665	3
HCAG_02703	60S acidic ribosomal protein P2	21399,19	459,3534	3
HCAG_04231	60S ribosomal protein	2621,479	184,6273	3
HCAG_00468	60S ribosomal protein	10051,12	278,1601	3
HCAG_01850	60S ribosomal protein L1	3674,466	152,7661	3
HCAG_04788	60S ribosomal protein L12	9150,942	98,03977	3
HCAG_07708	60S ribosomal protein L13	5709,767	152,4659	3
HCAG_03611	60S ribosomal protein L15	4184,901	186,1198	3
HCAG_00164	60S ribosomal protein L16	5060,965	0	2
HCAG_00164	60S ribosomal protein L16	5285,426	150,9131	3
HCAG_02327	60S ribosomal protein L17	3232,029	124,4935	3
HCAG_03593	60S ribosomal protein L18A	5298,849	217,2288	3
HCAG_07408	60S ribosomal protein L19	494,2522	164,5588	3
HCAG_08515	60S ribosomal protein L2	2682,03	204,5222	3
HCAG_04519	60S ribosomal protein L23	3975,727	182,2237	3
HCAG_03167	60S ribosomal protein L24	3306,132	160,2266	3
HCAG_00055	60S ribosomal protein L27 A	9320,229	178,0492	3
HCAG_03923	60S ribosomal protein L3	1918,177	172,8798	3
HCAG_04318	60S ribosomal protein L33 A	4364,667	138,3058	3
HCAG_04561	60S ribosomal protein L34	2622,963	141,5885	2
HCAG_04185	60S ribosomal protein L36	5124,866	112,371	3

HCAG_06534	60S ribosomal protein L43	2660,205	109,6931	2
HCAG_07397	60S ribosomal protein L44	757,6205	50,76385	2
HCAG_08444	60S ribosomal protein L5	20890,91	355,9934	3
HCAG_01793	60S ribosomal protein L6	4920,458	183,8818	3
HCAG_08706	60S ribosomal protein L7	10821,68	299,4507	3
HCAG_04927	Acetamidase	660,6712	48,3988	2
HCAG_01606	Acetate coa ligase	10923,25	376,7791	3
HCAG_08039	Acetoacetyl coa reductase	556,2205	53,8854	3
HCAG_06005	Acetolactate synthase	6257,934	181,4687	3
HCAG_00780	Acetyl-CoA acyltransferase A	594,4658	25,8668	2
HCAG_00814	Acetyl coa acetyltransferase	6222,945	101,2965	3
HCAG_08621	Acetyl coa acetyltransferase	1934,402	92,3328	3
HCAG_05266	Aconitase	8176,834	363,2409	3
HCAG_08210	Actin	4004,194	220,2239	3
HCAG_09978	Acyl coa dehydrogenase	1274,734	40,2888	3
HCAG_09977	Acyl coa dehydrogenase	1808,643	39,02885	2
HCAG_08510	Acyl coa dehydrogenase	2708,308	79,6237	3
HCAG_08512	Adenosine kinase	4412,19	152,7267	3
HCAG_10265	Adenosylhomocysteinase	20246,8	282,6097	3
HCAG_01433	Adenylosuccinate lyase	904,8631	74,99776	3
HCAG_06743	Adenylosuccinate synthetase adb	446,8559	25,8415	2
HCAG_06283	Adp ATP carrier protein	899,5107	84,60615	2
HCAG_01847	ADP ribosylation factor	4785,139	130,7831	2
HCAG_08426	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3	1726,297	29,3097	2
HCAG_04426	AIF like mitochondrial oxidoreductase	1554,428	105,5596	3
HCAG_01578	Alcohol dehydrogenase	1022,443	49,0853	2
HCAG_02317	Alcohol dehydrogenase	2333,302	60,54857	3
HCAG_06397	Alcohol dehydrogenase	4000,911	145,3657	3

HCAG_05083	Alcohol dehydrogenase	484,7904	86,3563	3
HCAG_08561	Alcohol dehydrogenase	1717,925	102,6661	3
HCAG_00576	Alcohol dehydrogenase	570,2202	27,4746	2
HCAG_02371	Aldehyde dehydrogenase	9548,739	479,7115	3
HCAG_06205	Aldehyde dehydrogenase	1162,125	69,94363	3
HCAG_00980	Alkaline phosphatase	1848,132	73,92933	3
HCAG_03188	Allergen Asp F3	4377,332	92,9481	2
HCAG_01535	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase	370,4913	58,32165	2
HCAG_04617	Amino transferase	886,9272	44,94923	3
HCAG_06935	Aminopeptidase	2073,67	139,8825	3
HCAG_07083	Aminopeptidase	1300,714	101,0619	3
HCAG_05224	Anthranilate synthase component I	889,6423	46,24356	3
HCAG_00035	Arginase	1191,142	65,40557	3
HCAG_07805	Argininosuccinate lyase	445,6001	32,26823	3
HCAG_06683	Argininosuccinate synthetase	4144,891	132,9179	3
HCAG_04706	ARP2 3 complex subunit	681,519	22,11807	3
HCAG_08678	Aspartate aminotransferase	1859,221	101,4998	3
HCAG_06102	Aspartate aminotransferase	1829,467	123,0136	3
HCAG_00037	Aspartic endopeptidase Pep2	3331,652	224,2575	3
HCAG_04297	Aspartyl aminopeptidase	599,9355	89,45097	3
HCAG_10740	Aspartyl trna synthetase	408,0021	31,12613	3
HCAG_04933	ATP citrate lyase	1465,942	144,323	3
HCAG_04934	ATP citrate synthase subunit 1	2515,303	133,7744	3
HCAG_04273	ATP dependent RNA helicase eif4a	1906,92	46,98973	3
HCAG_06360	ATP phosphoribosyltransferase	1931,301	38,05836	3
HCAG_04799	ATP synthase gamma chain	3571,415	82,10416	3
HCAG_02828	ATP synthase subunit 4	914,0566	61,72365	2
HCAG_02813	ATP synthase subunit alpha	9441,877	335,7782	3

HCAG_07132	BAR domain containing protein	907,6732	45,2939	2
HCAG_02260	Beta isopropylmalate dehydrogenase	924,9158	111,5034	3
HCAG_04224	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE16	2698,355	117,0407	3
HCAG_03336	Branched chain alpha keto acid dehydrogenase E1 subunit beta	1219,174	61,6188	2
HCAG_03302	Branched chain amino acid aminotransferase	3702,893	147,9276	3
HCAG_08945	Branched chain amino acid aminotransferase	1279,736	43,1891	3
HCAG_04357	C 1 tetrahydrofolate synthase	506,8049	60,80383	3
HCAG_02700	Carbamoyl phosphate synthase	349,696	36,00227	3
HCAG_04508	Carboxypeptidase	707,7655	76,97805	2
HCAG_03790	Carnitine acetyl transferase	1589,52	87,55869	3
HCAG_08064	Catalase B	7718,121	458,736	3
HCAG_05109	Catalase	830,4074	71,2571	3
HCAG_08345	Cell cycle control protein	2857,38	109,1026	3
HCAG_02452	Cell division cycle protein	3953,202	125,5184	3
HCAG_00290	Chorismate mutase	457,0327	30,18975	2
HCAG_06981	Citrate synthase	5206,978	129,2851	3
HCAG_05565	Cobalamin independent methionine synthase meth D	17091,59	396,1695	3
HCAG_08732	Conserved hypothetical protein	11369,82	232,6765	3
HCAG_04397	Conserved hypothetical protein	31733,56	492,436	3
HCAG_05185	Conserved hypothetical protein	10186,69	145,7858	3
HCAG_04453	Conserved hypothetical protein	11834,89	328,9261	3
HCAG_06099	Conserved hypothetical protein	1716,874	20,9307	2
HCAG_11214	Conserved hypothetical protein	1072,553	40,8104	3
HCAG_06375	Conserved hypothetical protein	1834,543	67,5463	3
HCAG_06271	Conserved hypothetical protein	1396,959	83,15905	2
HCAG_04776	Conserved hypothetical protein	1924,963	45,5018	3
HCAG_06999	Conserved hypothetical protein	921,8329	50,8253	2
HCAG_00803	Conserved hypothetical protein	2875,682	175,5884	3

HCAG_01543	Conserved hypothetical protein	1031,696	63,14527	3
HCAG_07305	Conserved hypothetical protein	3858,993	141,7529	3
HCAG_08357	Conserved hypothetical protein	0,21985	0	2
HCAG_03758	Conserved hypothetical protein	748,5057	47,87605	2
HCAG_08106	Conserved hypothetical protein	6854,198	291,7614	3
HCAG_02919	Conserved hypothetical protein	18296,61	288,0587	3
HCAG_01717	Conserved hypothetical protein	582,5349	76,71436	3
HCAG_01715	Conserved hypothetical protein	430,4391	22,44875	2
HCAG_05962	Conserved hypothetical protein	397,2354	42,23805	2
HCAG_08367	Conserved hypothetical protein	24719,58	892,1055	3
HCAG_11293	Conserved hypothetical protein	2373,276	176,1933	3
HCAG_06889	Conserved hypothetical protein	555,1629	43,21313	3
HCAG_01864	Copper amine oxidase	946,0996	100,0781	3
HCAG_00642	Copper zinc superoxide dismutase	15063,14	268,1146	3
HCAG_06523	Curved DNA binding protein	2367,092	171,3637	3
HCAG_07434	Cystathionine beta synthase	563,2045	32,7928	2
HCAG_07539	Cytochrome b2	860,3229	39,97995	2
HCAG_09319	Cytochrome c peroxidase	5472,729	85,9399	2
HCAG_07098	Cytochrome c peroxidase	675,1393	63,63453	3
HCAG_03694	Cytosolic large ribosomal subunit protein L30	12073,23	207,4935	3
HCAG_01780	Delta 1 pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase prnc	1509,328	157,907	2
HCAG_09000	Delta 1 pyrroline 5 carboxylate dehydrogenase prnc	2301,627	100,3765	3
HCAG_03972	Dihydrolipoamide acetyltransferase component	1265,468	85,90917	3
HCAG_01491	Dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	1058,104	58,778	2
HCAG_08825	Dihydrolipoamide dehydrogenase	4753,039	145,0324	3
HCAG_03522	Dihydrolipoamide succinyltransferase	823,386	58,3916	3
HCAG_03216	Dihydroorotase	456,6449	20,52707	3
HCAG_02555	Dihydroxyacetone kinase	469,6963	30,04223	3

HCAG_08942	Dipeptidyl peptidase III	610,2379	51,0808	3
HCAG_05596	Diphosphomevalonate decarboxylase	1261,119	39,7084	3
HCAG_04527	DNA damage checkpoint protein rad24	14364,2	273,2786	3
HCAG_05805	DNAK molecular chaperone bipa	1577,313	137,0227	3
HCAG_07572	DUF427 domain containing protein	8885,566	281,0556	3
HCAG_07065	DUF757 domain containing protein	1260,291	29,68417	3
HCAG_03847	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	1121,552	75,21796	3
HCAG_02931	Electron transfer flavoprotein beta subunit	474,0967	43,39253	3
HCAG_01917	Elicitor protein	4095,753	201,6862	3
HCAG_01784	Elongation factor 1 beta	10332,55	314,6603	3
HCAG_08236	Elongation factor 1 gamma	4988,462	162,1948	3
HCAG_05988	Elongation factor 2	8982,82	332,0243	3
HCAG_03444	Elongation factor Tu	715,2623	40,39155	2
HCAG_05757	Endonuclease exonuclease phosphatase family protein	959,1799	59,1693	3
HCAG_08058	Enoyl coa hydratase isomerase family protein	2925,334	140,7189	3
HCAG_04675	Esterase D	743,4541	95,5532	2
HCAG_04139	Eukaryotic phosphomannomutase	833,2692	0	2
HCAG_04139	Eukaryotic phosphomannomutase	1753,029	66,2838	3
HCAG_03286	Eukaryotic translation initiation factor 3	561,7601	37,32055	2
HCAG_04356	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2	595,5848	25,85705	2
HCAG_11321	FAD dependent oxidoreductase	804,491	51,9047	2
HCAG_00413	Farnesyl pyrophosphate synthetase	1608,288	98,53577	3
HCAG_07636	Fatty acid synthase alpha subunit fasa	575,1721	81,3917	3
HCAG_07637	Fatty acid synthase beta subunit dehydratase	852,2354	80,87833	3
HCAG_07972	FKBP type peptidyl prolyl isomerase putative	2645,194	62,90073	3
HCAG_08831	Formamidase	20893,82	1309,6	3
HCAG_00010	Fructose 1 6 biphosphate aldolase	19061,63	594,4607	3
HCAG_03322	Fructose 1 6 bisphosphatase	5285,171	187,6622	3

HCAG_08789	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	749,9816	23,12893	3
HCAG_08493	Fumarate hydratase class II	10235,79	292,2123	3
HCAG_03323	Fumarate reductase flavoprotein subunit	7494,181	256,8914	3
HCAG_02120	Fumarylacetoacetase hydrolase family protein	3283,069	185,8748	3
HCAG_07031	G protein complex beta subunit cpcb	11282,84	339,8324	3
HCAG_06177	Gamma glutamyltranspeptidase	526,0381	58,23315	2
HCAG_03191	Glucokinase	373,2939	28,3911	3
HCAG_04329	Glucose 6 phosphate 1 dehydrogenase	829,2949	65,74287	3
HCAG_08202	Glucose 6 phosphate isomerase	4130,857	183,4036	3
HCAG_08670	Glucose methanol choline oxidoreductase	896,7271	82,27527	3
HCAG_03543	Glutamate carboxypeptidase	8651,085	270,0707	3
HCAG_08662	Glutamate decarboxylase	827,3544	43,65443	3
HCAG_07206	Glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase	1249,904	151,9206	3
HCAG_01006	Glutathione S transferase	1289,724	55,5599	3
HCAG_04910	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	49020,48	1104,176	3
HCAG_03267	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase	1356,338	72,08383	3
HCAG_07571	Glycine dehydrogenase	1945,591	106,2676	3
HCAG_02914	Glycine rich protein	6648,504	191,7505	3
HCAG_05187	GTP binding nuclear protein GSP1 Ran	8724,307	151,5491	3
HCAG_01447	GTP binding protein	423,7395	29,68835	2
HCAG_08408	HAD superfamily hydrolase	15837,67	538,5853	3
HCAG_04686	Heat shock protein	8155,877	191,1247	3
HCAG_00806	Heat shock protein SSB1	3750,913	152,6033	3
HCAG_08176	Heat shock protein SSC1	3421,905	120,984	3
HCAG_04471	Heat shock protein STI1	1266,735	58,921	3
HCAG_01131	Het c2 protein	465,9147	21,53045	2
HCAG_03661	Hexokinase hxx Aspergillus niger	1001,208	59,61147	3
HCAG_08082	HHE domain containing protein	1447,131	26,7777	3

HCAG_03525	Histone H2b	1871,868	93,55044	3
HCAG_03885	Histone h4	663,4111	38,8617	2
HCAG_05721	Homogentisate 1 2 dioxygenase	1293,736	115,7595	3
HCAG_04943	Hsp10 like protein	2736,095	91,822	3
HCAG_06961	Hsp60 like protein	6385,055	177,1423	3
HCAG_01398	Hsp70 like protein	16194,24	455,0894	3
HCAG_00783	Hsp88 like protein	2728,837	94,04237	3
HCAG_02530	Hydroxyacylglutathione hydrolase	925,4011	54,70835	2
HCAG_08805	Hydroxymethylglutaryl coa synthase	933,5016	86,13765	2
HCAG_05533	Hypothetical protein	15199,45	193,9634	3
HCAG_07506	Hypothetical protein	13566,85	120,9035	3
HCAG_06895	Hypothetical protein	1054,513	78,41463	3
HCAG_08057	Hypothetical protein	2065,569	87,04247	3
HCAG_06361	Hypothetical protein	26314,31	222,7411	3
HCAG_06110	Immunogenic protein	1972,064	136,1923	3
HCAG_04432	Indoleamine 2 3 dioxygenase family protein	1806,859	60,20073	3
HCAG_04307	Inorganic pyrophosphatase	713,3729	42,4819	2
HCAG_10958	Isocitrate lyase	6642,721	153,6943	3
HCAG_05089	Isocitrate lyase	811,584	72,62807	3
HCAG_06694	Isoleucyl trna synthetase cytoplasmic	510,1708	62,37294	3
HCAG_00677	Isovaleryl coa dehydrogenase	1284,676	76,4362	3
HCAG_08890	Ketol acid reductoisomerase	5126,488	228,6571	3
HCAG_06295	KH domain RNA binding protein	2010,071	45,01534	3
HCAG_00626	L xylulose reductase	7742,359	237,2688	3
HCAG_01368	Lactoylglutathione lyase	3072,072	84,62014	3
HCAG_05713	Lysyl trna synthetase	1731,838	74,5043	3
HCAG_06901	Malate dehydrogenase	19050,05	260,1951	3
HCAG_03969	Malate dehydrogenase	31711	363,2881	3

HCAG_05084	Malate synthase	3790,179	170,7948	3
HCAG_03448	Manganese superoxide dismutase	6853,66	265,6224	3
HCAG_08720	Mannitol 1 phosphate dehydrogenase	7237,526	220,0057	3
HCAG_08436	Mannose 6 phosphate isomerase	1291,541	39,23697	3
HCAG_00676	Methylcrotonoyl coa carboxylase beta chain	928,3769	57,99833	3
HCAG_06059	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	12767,66	377,3372	3
HCAG_05584	Mitochondrial acetolactate synthase small subunit	639,6602	22,2244	2
HCAG_06944	Mitochondrial ATP synthase	17559,9	334,6869	3
HCAG_00064	N acetylglucosamine phosphate mutase	1657,187	53,62407	3
HCAG_11124	NAD dependent formate dehydrogenase acia Fdh	9185,157	594,4974	3
HCAG_04093	NAD isocitrate dehydrogenase subunit I	980,3948	20,32615	2
HCAG_03605	NADP dependent mannitol dehydrogenase	30627,26	672,968	3
HCAG_05099	Nascent polypeptide associated complex subunit alpha	3692,202	112,4443	3
HCAG_05051	Nascent polypeptide associated complex subunit beta	4437,551	61,95777	3
HCAG_03497	Nicotinate nucleotide pyrophosphorylase	1964,994	82,313	3
HCAG_07200	Nitrate reductase	1082,796	57,6576	3
HCAG_07558	Nmra like family domain containing protein	986,0771	62,71065	2
HCAG_08974	Nonspecific lipid transfer protein	810,8122	61,20343	3
HCAG_00131	Nuclear transport factor 2	1311,066	62,7095	2
HCAG_00544	Nucleoside diphosphate kinase	11436,46	255,8506	3
HCAG_03106	Nucleosome assembly protein	1708,47	67,73977	3
HCAG_00018	Nucleosome binding protein	1079,603	66,92924	2
HCAG_07004	O acetylhomoserine	1248,258	47,57994	3
HCAG_02754	Oligopeptidase family protein	1674,133	35,7242	3
HCAG_08190	Oxidoreductase 2 nitropropane dioxygenase	2209,618	126,1198	3
HCAG_00429	Oxidoreductase	1396,88	51,9609	2
HCAG_00889	Oxidoreductase	6165,615	147,1975	3
HCAG_05959	Oxidoreductase	833,6923	35,4285	2

HCAG_08156	Oxidoreductase	1067,854	55,66087	3
HCAG_06234	PEP phosphonomutase	821,0222	35,2191	2
HCAG_08833	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	1354,984	53,55167	3
HCAG_04215	Peptidyl prolyl cis trans isomerase B	1366,089	25,85685	2
HCAG_04485	Peptidylprolyl isomerase	20365,25	1203,366	3
HCAG_00067	Peroxisomal dehydratase	1348,881	46,02555	2
HCAG_04358	Peroxisomal NADP dependent isocitrate dehydrogenase	4923,432	131,7134	3
HCAG_06371	Phenylacetyl coa ligase	616,4225	28,739	2
HCAG_04499	Phenylalanyl trna synthetase	596,5448	30,8062	2
HCAG_03270	Phospho 2 dehydro 3 deoxyheptonate aldolase	937,7212	47,5069	2
HCAG_08116	Phospho 2 dehydro 3 deoxyheptonate aldolase	578,5984	32,21827	3
HCAG_05681	Phosphoenolpyruvate carboxykinase acuf	1745,127	143,1986	3
HCAG_07552	Phosphofructokinase	502,8675	26,34973	3
HCAG_08808	Phosphoglucomutase	937,7065	67,73376	3
HCAG_03385	Phosphoglycerate kinase	10755,49	395,0895	3
HCAG_06026	Polyadenylate binding protein	611,8305	65,18793	3
HCAG_02662	Porphobilinogen deaminase	618,114	37,32035	2
HCAG_08909	Predicted protein	3605,773	123,4843	3
HCAG_02758	Predicted protein	4224,784	172,4829	3
HCAG_04835	Proliferating cell nuclear antigen	2562,088	124,9164	3
HCAG_04190	Proteasome component	1988,271	37,29025	2
HCAG_06342	Proteasome component	515,4178	58,05695	2
HCAG_04101	Proteasome component	2018,485	63,20977	3
HCAG_00347	Proteasome component	2755,601	60,51663	3
HCAG_03939	Proteasome component	752,1971	51,20415	2
HCAG_03630	Proteindisulfidisomerase	2207,747	169,5233	3
HCAG_02994	Pyridoxine biosynthesis protein pyroa validated	8846,832	151,6493	3
HCAG_04227	Pyruvate carboxylase	2930,833	122,8378	3

HCAG_08778	Pyruvate decarboxylase	1870,131	106,9793	3
HCAG_01360	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	1658,188	94,74577	3
HCAG_07619	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	2820,377	103,0271	3
HCAG_07781	Pyruvate kinase	6260,613	119,3218	3
HCAG_06198	QDE2 protein	756,4883	36,57727	3
HCAG_02612	Ran specific gtpase activating protein	1781,451	96,45235	2
HCAG_03115	Rheb small monomeric gtpase rhba	735,4984	20,55965	2
HCAG_05560	Rho gtpase	505,885	29,5225	3
HCAG_04939	Ribose 5 phosphate isomerase A	675,9375	36,71054	3
HCAG_03695	Ribosomal L10 protein	6528,958	241,6813	3
HCAG_03504	Ribosomal protein L22	4629,596	171,2169	3
HCAG_04987	Ribosomal protein l22e	5001,365	196,4432	3
HCAG_03055	Ribosomal protein L23a	3054,514	136,3122	3
HCAG_05192	Ribosomal protein L31e	6498,029	212,2969	3
HCAG_06425	Ribosomal protein L32	9567,836	213,3697	3
HCAG_05221	Ribosomal protein L7a	9853,339	253,0529	3
HCAG_04856	Ribosomal protein P0	4780,641	229,6509	3
HCAG_04662	Ribosomal protein S13	10046,71	219,3145	3
HCAG_04575	Ribosomal protein S16	9060,794	271,8549	3
HCAG_08821	Ribosomal protein S20	4770,102	202,9201	3
HCAG_04498	Ribosomal protein s21e	11731,47	239,1255	3
HCAG_01947	Ribosomal protein S23	1814,796	145,8665	3
HCAG_07237	Ribosomal protein S4	6952,087	336,9375	3
HCAG_07961	Ribosomal protein S5	7712,412	307,4359	3
HCAG_01666	Ribosomal protein S6	3240,884	115,4239	3
HCAG_08073	Ribosomal protein S9	9489,132	201,4683	3
HCAG_04410	RNA binding protein	1484,292	85,57104	3
HCAG_03428	S adenosylmethionine synthetase	4126,722	135,0952	3

HCAG_01145	Saccharopine dehydrogenase	2468,422	124,9878	3
HCAG_01575	Saccharopine reductase	5558,524	168,2124	3
HCAG_05465	Sec14 cytosolic factor	607,2944	40,61875	2
HCAG_07830	Secretory pathway gdp dissociation inhibitor	2555,296	88,19006	3
HCAG_00717	Septin 1	1259,944	66,00933	3
HCAG_00459	Septin 2	872,6402	75,16444	3
HCAG_02006	Septin 3	1102,727	45,80217	3
HCAG_03836	Septin	873,0353	47,7895	3
HCAG_05408	Serine hydroxymethyltransferase	3565,471	79,79577	3
HCAG_07418	Serine hydroxymethyltransferase	1302,793	93,37479	3
HCAG_00635	Serine proteinase	642,156	71,48815	2
HCAG_04969	Serine threonine protein phosphatase	621,7549	25,05765	2
HCAG_05071	Short chain dehydrogenase	1549,844	26,61573	3
HCAG_04443	Short chain dehydrogenase reductase	3210,883	45,04783	3
HCAG_00118	Short chain dehydrogenase reductase	841,5723	60,64174	3
HCAG_04999	Spermidine synthase	5559,919	244,5098	3
HCAG_05184	Stress protein DDR48	2002,505	230,4442	3
HCAG_03348	Stress responsive A B barrel domain containing protein	727,504	25,11937	3
HCAG_10301	Suaprga1	975,5952	75,4578	3
HCAG_06317	Succinate dehydrogenase	620,0397	43,2296	3
HCAG_07261	Succinate semialdehyde dehydrogenase	1376,718	54,78003	3
HCAG_05311	Succinyl coa 3 ketoacid coenzyme A transferase	1229,656	91,72137	3
HCAG_07697	Succinyl coa ligase beta chain	1143,488	51,70573	3
HCAG_01212	Sulfate adenylyltransferase	961,9276	55,6312	3
HCAG_03008	Sulfur metabolite repression control protein	5106,448	63,3235	3
HCAG_05697	T complex protein 1 epsilon subunit	871,2639	37,58537	3
HCAG_06315	T complex protein 1 subunit delta	610,7462	36,2257	2
HCAG_02143	TCTP family protein	10244,84	126,6398	3

HCAG_03261	Thiamine biosynthesis protein	1754,254	64,37814	3
HCAG_05915	Thiazole biosynthetic enzyme	6234,246	265,9257	3
HCAG_06128	Thij pfpi family protein	4375,741	258,2695	3
HCAG_06210	Thiol specific antioxidant	11149,17	190,9329	3
HCAG_00878	Thioredoxin domain containing protein	26346,34	171,0643	3
HCAG_07096	Thioredoxin domain containing protein	610,1503	24,9219	2
HCAG_00793	Threonine synthase	1258,825	35,2403	2
HCAG_00638	Transaldolase	3553,865	227,0938	3
HCAG_01318	Transcription factor rfef putative	5576,498	181,5082	3
HCAG_05000	Transketolase tkta	2826,619	166,641	3
HCAG_08798	Translation elongation factor 1 alpha	13347,61	761,584	3
HCAG_06021	Translation initiation factor eif 5A putative	1677,034	40,08437	3
HCAG_02511	Triosephosphate isomerase	10974,52	213,1973	3
HCAG_01781	Tubulin beta chain	717,8038	35,5011	3
HCAG_08288	Tubulin subunit alpha 2	572,0717	31,2687	2
HCAG_04336	Tyrosinase	808,3245	83,5613	3
HCAG_06019	Ubiquitin	11173,3	111,632	2
HCAG_06566	Ubiquitin fusion protein	11227,73	405,2535	3
HCAG_09628	Ubiquitin activating enzyme E1	740,4038	40,1133	3
HCAG_06641	UDP galactopyranose mutase	682,4587	33,6422	3
HCAG_09614	UDP glucose 4 epimerase	1282,239	61,382	3
HCAG_09613	UDP glucose 4 epimerase Gal10	1639,242	56,6437	3
HCAG_04416	UDP N acetylglucosamine pyrophosphorylase	2250,071	78,625	3
HCAG_06192	UPF0010 domain containing protein	1321,759	43,6643	3
HCAG_00404	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	571,5181	48,4494	3
HCAG_06619	Vacuolar sorting associated protein	598,0339	29,11115	2
HCAG_02992	Xaa pro aminopeptidase	1285,528	73,3595	3
HCAG_07700	Xanthine phosphoribosyltransferase	800,2833	31,5309	2

HCAG_04745 Y20 protein	37765,37	241,6923	3
------------------------	----------	----------	---

^a Identificação de proteínas no banco de dados do genoma de *Histoplasma* usando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, Reino Unido) (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html).

^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

APÊNDICE C – TABELA SUPLEMENTAR 3

Tabela suplementar 3: Proteínas identificadas em *Histoplasma capsulatum* mais abundantes em levedura em relação a micélio

Número de acesso^a	Descrição da proteína^b	Score	Relação Levedura/Micélio^c
Categorias funcionais^d			
1. METABOLISMO			
Metabolismo de aminoácidos			
HCAG_08247	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	1660,32	*
HCAG_09984	2-isopropylmalate synthase	751,82	2,1382762
HCAG_07104	3-isopropylmalate desidratase	2673,21	1,537257535
HCAG_06743	Adenylosuccinate synthetase adb	1665,4	1,750672504
HCAG_10952	Alanine glyoxylate aminotransferase	414,98	*
HCAG_05679	Alanine transaminase	879,78	*
HCAG_05224	Anthranilate synthase component I	1765,98	1,954237353
HCAG_00748	Anthranilate synthase multifunctional enzyme	568,1	*
HCAG_00035	Arginase	4072,51	1,69893226
HCAG_06102	Aspartate aminotransferase	2279,99	1,50681778
HCAG_03751	Aspartate aminotransferase	464,49	*
HCAG_08678	Aspartate aminotransferase	9312,15	1,993715528
HCAG_08945	Branched chain amino acid aminotransferase	2667	1,768267039
HCAG_00290	Chorismate mutase	1601,71	1,648721271
HCAG_04326	Cystathionine beta-synthase	1879,67	*
HCAG_00220	Cysteine dioxygenase	587,28	*
HCAG_00386	Cysteine synthase o acetylserine thiol lyase	618,51	*
HCAG_07464	Gamma glutamyl phosphate reductase	2513,15	*

HCAG_05651	Glutamate dehydrogenase	1340,04	*
HCAG_09757	Glutamate synthase	489,43	*
HCAG_05070	Glutamine synthetase	463,23	*
HCAG_07028	Glutamine synthetase partial	3066,2	*
HCAG_02357	Histidinol dehydrogenase	575,85	*
HCAG_06098	Homocitrate synthase	2328,53	2,534509196
HCAG_00014	Homoserine dehydrogenase	740,91	1,822118844
HCAG_08890	Ketol acid reductoisomerase	14496,76	2,316366916
HCAG_09107	L amino adipate semialdehyde dehydrogenase large subunit	502,64	*
HCAG_05584	Mitochondrial acetolactate synthase small subunit	763,43	1,822118844
HCAG_00029	Mitochondrial methylglutaconyl coa hydratase	381,98	*
HCAG_05073	N acetyl gamma glutamyl phosphate reductase	561,61	*
HCAG_03650	NAD specific glutamate dehydrogenase	956,08	2,159766213
HCAG_07418	Serine hydroxymethyltransferase	3505,89	1,568312167
HCAG_06253	Threonine dehydratase	369,45	*

Metabolismo de nitrogênio, enxofre e selênio

HCAG_05304	Acetamidase	556,04	*
HCAG_03008	Sulfur metabolite repression control protein	13211,48	1,69893226

Metabolismo de nucleotídeos

HCAG_05730	3,5-bisphosphate nucleotidase	440,92	*
HCAG_09104	Adenylate kinase	411,51	*
HCAG_04776	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	9236,77	2,801065755
HCAG_04496	GMP synthase putative	1405,55	*
HCAG_02007	Guanylate kinase	753,74	*

HCAG_04495	Inosine 5 monophosphate dehydrogenase IMD2	517,96	*
HCAG_03809	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	462,86	*
HCAG_06816	Ribose phosphate pyrophosphokinase	419,75	*
HCAG_00005	Rnapii degradation factor def1	1257,86	1,648721271
HCAG_07700	Xanthine phosphoribosyltransferase	2181,6	1,632316236

Metabolismo de carbohidratos

HCAG_07210	1,3-beta-glucanosyltransferase	424,86	*
HCAG_07199	Aldehyde reductase I	5599,84	5,929856249
HCAG_00318	Alpha-1,3-mannosyltransferase	99,96	*
HCAG_02211	Alpha glucosidase	393,48	*
HCAG_08290	Gamma butyrobetaine dioxygenase	499,41	1,87761057
HCAG_05711	GDP mannose pyrophosphorylase A	2220,39	*
HCAG_01828	Glucan 1,3-beta-glucosidase	394,39	*
HCAG_08152	Glucosamine-6-phosphate deaminase	601,67	*
HCAG_04088	Glucosamine fructose-6-phosphate aminotransferase	5594,67	3,935350714
HCAG_06296	Ketoreductase	439,18	*
HCAG_01552	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	1257,19	2,915379653
HCAG_00064	N acetylglucosamine phosphate mutase	3928,04	1,716006899
HCAG_08808	Phosphoglucomutase	1955,24	1,521961536
HCAG_06641	UDP galactopyranose mutase	1000,06	1,682027618
HCAG_07375	Malic enzyme	435,48	*

Metabolismo de lipídios e ácidos graxos

HCAG_02524	3-hydroxyisobutyryl-coa hydrolase	3131,38	2,117000017
HCAG_05042	Acyl protein thioesterase	428,01	*

HCAG_03333	Citrate lyase subunit beta	529,8	*
HCAG_03803	Hydroxymethylglutaryl-coa lyase	536,56	*
HCAG_01797	Sphingosine kinase	391,09	*
HCAG_07622	Trans-2-enoyl-coa reductase	1325,1	*

Metabolismo de vitaminas e co-fatores

HCAG_02020	Delta aminolevulinic acid dehydratase	386,38	*
HCAG_03497	Nicotinate nucleotide pyrophosphorylase	4850,88	1,584073998
HCAG_00907	NUDIX hydrolase	713,38	*
HCAG_04775	Pyridoxine kinase	511,08	*
HCAG_07304	Thiamine phosphate pyrophosphorylase	415,42	*

2. ENERGIA

Glicólise e Gliconeogênese

HCAG_08561	Alcohol dehydrogenase	11737,45	2,718281828
------------	-----------------------	----------	-------------

Ciclo do ácido tricarboxílico

HCAG_05531	Aconitate hydratase	0	*
HCAG_01535	Alpha-ketoglutarate dehydrogenase	755,11	1,599994191
HCAG_04093	Isocitrate dehydrogenase subunit 1, mitochondrial precursor	3417,77	2,054433269
HCAG_04294	Pyruvate dehydrogenase complex component Pdx1	1551,66	*
HCAG_06317	Succinate dehydrogenase	1846,04	1,552707215
HCAG_07697	Succinyl coa ligase beta chain	4023,32	1,733253039

Transporte de elétrons e conservação de energia associada à membrana

HCAG_05938	Cytochrome c	2330,65	1,840431425
------------	--------------	---------	-------------

HCAG_00943	Ubiquinol cytochrome c reductase iron sulfur subunit	411,23	*
Respiração			
HCAG_03721	Alternative oxidase	462,41	*
HCAG_02171	ATP synthase subunit g	477,75	*
HCAG_00437	Cytochrome c oxidase chain VI	3001,22	1,733253039
HCAG_06996	Processing enhancing protein	1222,96	*
HCAG_03209	Vacuolar ATP synthase subunit E	773,82	*
β-oxidação			
HCAG_09712	Acetoacetyl coa synthase	453,92	*
HCAG_06958	Long chain fatty acid coa ligase	487,49	*
HCAG_05071	Short chain dehydrogenase	4101,87	2,459603053
Conversão de energia			
HCAG_08801	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit H	1279,51	*
3. CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA			
Processamento de DNA			
HCAG_00486	Chromatin assembly factor 1 subunit C	451,54	*
HCAG_03616	HIRA interacting protein	602,75	*
HCAG_04914	Histone H2A	2238,71	*
HCAG_04835	Proliferating cell nuclear antigen	8226,67	2,559981412
HCAG_02026	Replication factor A 1	514,98	*
HCAG_01673	Ruvb like helicase	598,11	*
HCAG_02975	Ssdna binding protein	5580,13	1,50681778

Ciclo celular

HCAG_00848	Arp2/3 complex subunit	1035,21	*
HCAG_01653	Cell division control protein	505,93	*
HCAG_01332	Cell division cycle protein 37	904,87	*
HCAG_07829	Condensin	17,75	*
HCAG_05172	Deubiquitination protection protein dph1	793,97	*
HCAG_06605	EB1 protein	436,01	*
HCAG_01730	G2/M phase checkpoint control protein Sum2	559,35	9,393331377
HCAG_03524	Histone H2A	3400,57	4,014849996
HCAG_03525	Histone H2B	12100,49	2,915379653
HCAG_01156	M protein repeat protein	417,54	*
HCAG_07172	Mob1 family protein	363,51	*
HCAG_09244	Nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA binding protein pub1	1784,13	*
HCAG_06735	Nuclear segregation protein Bfr1 putative	384,16	*
HCAG_04938	Spindle assembly checkpoint protein SLDB	586,97	*

4. TRANSCRIÇÃO

HCAG_00922	ATP dependent RNA helicase DBP7	400,66	*
HCAG_05061	ATP dependent RNA helicase SUB2	1580,8	*
HCAG_06885	Cap binding protein	1033,23	*
HCAG_00337	Cleavage and polyadenylation specificity factor	1749,74	1,954237353
HCAG_02903	Cyclin dependent protein kinase regulator	473,44	*
HCAG_10129	Gtpase activating protein	384,81	*
HCAG_08774	Histone chaperone ASF1	2063,15	*

HCAG_06701	Histone H3	1333,51	2,225540955
HCAG_03885	Histone H4	4116,49	2,534509196
HCAG_03732	KH domain RNA binding protein	597,22	*
HCAG_04339	Multi bridging factor 1 putative	2269,62	*
HCAG_05099	Nascent polypeptide associated complex subunit alpha	8198,24	1,750672504
HCAG_05051	Nascent polypeptide associated complex subunit beta	19731,5	1,568312167
HCAG_05924	Nuclear polyadenylated RNA-binding protein NAB2	459,65	2,316366916
HCAG_02807	Nucleic acid binding protein	752,54	*
HCAG_00461	Pre mrna processing protein	368,44	*
HCAG_11185	Pre mrna processing protein	397,63	*
HCAG_01906	Ran gtpase activating protein	582,08	1,584073998
HCAG_08342	RNA binding domain containing protein	526,11	*
HCAG_08343	RNA binding domain-containing protein	6623,62	*
HCAG_00646	RNA binding protein	472,57	*
HCAG_04410	RNA binding protein	3653,29	1,616074385
HCAG_04664	RNA recognition domain containing protein family protein	783,29	*
HCAG_00597	Rnase III domain containing protein	468,43	*
HCAG_02082	Ruvb like helicase	372,06	*
HCAG_08281	Small nuclear ribonucleoprotein LSM2	929,19	1,915540783
HCAG_01854	Small nuclear ribonucleoprotein Lsm8	1380,64	*
HCAG_03703	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	1060,44	*
HCAG_01311	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	2948,13	2,247907992
HCAG_01049	Small nuclear ribonucleoprotein smf	1747,81	*
HCAG_02780	Small nuclear ribonucleoprotein smg	1828,66	*
HCAG_00910	Small nuclear ribonucleoprotein U2A	977,19	*
HCAG_00407	Splicing factor 3A subunit 3	373,06	*

HCAG_05023	Splicing factor 3B	390,98	*
HCAG_06525	Transcription factor Snf5p	383,61	*
HCAG_02611	Transcription initiation factor TFIID subunit 14	1290,44	2,225540955
HCAG_03203	Transcriptional activator	387,1	*
HCAG_06889	Transcriptional repressor TUP1	632,61	1,648721271
HCAG_01469	Trna ligase	246,81	*
HCAG_08192	U1 snrnp-associated protein Usp107	1092,85	5,155169438

5. SÍNTESE DE PROTEÍNAS

HCAG_06035	30S ribosomal protein S7	381,75	*
HCAG_05528	40S ribosomal protein s26	12600,74	3,525421454
HCAG_01353	50S ribosomal protein L12	1667,79	*
HCAG_05533	60S acidic ribosomal protein P1	23882	1,632316236
HCAG_02703	60S acidic ribosomal protein P2	42675,45	1,50681778
HCAG_07248	60S ribosomal protein L21	7476,61	1,716006899
HCAG_08351	60S ribosomal protein L26	2791,51	*
HCAG_04561	60S ribosomal protein L34	2552,83	1,537257535
HCAG_04246	60S ribosomal protein L38	2652,12	*
HCAG_01871	Alanyl trna synthetase	686,05	*
HCAG_03866	Arginyl trna synthetase	373,08	*
HCAG_04273	ATP dependent RNA helicase eif4a	13495,53	4,137120263
HCAG_00406	ATP dependent RNA helicase FAL1	1813,32	2,339646908
HCAG_00616	Cysteinyl trna synthetase	772,71	*
HCAG_03444	Elongation factor Tu	5007,09	3,387187831
HCAG_01136	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit	834,79	*
HCAG_04206	Eukaryotic translation initiation factor 2 gamma subunit	435,67	*

HCAG_08080	Eukaryotic translation initiation factor 3	1359,85	*
HCAG_03286	Eukaryotic translation initiation factor 3	1202,74	1,521961536
HCAG_08183	Eukaryotic translation initiation factor 3	1160,72	*
HCAG_08704	Eukaryotic translation initiation factor 3	712,63	*
HCAG_04356	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2	1307,59	1,786038401
HCAG_03353	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3	492,92	3,287081395
HCAG_00044	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6	564,66	*
HCAG_01956	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit eifc	2711,24	1,803988368
HCAG_05402	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	1041,4	*
HCAG_01919	Glutamyl trna synthetase	385,5	*
HCAG_03017	Glycyl trna synthetase	401,95	*
HCAG_05229	Leucyl trna synthetase	363,77	*
HCAG_00215	Phenylalanyl trna synthetase	467,77	*
HCAG_07283	Prolyl trna synthetase	1386,4	*
HCAG_08383	Psi protein	1264,93	*
HCAG_03112	Seryl trna synthetase	1008,97	*
HCAG_01178	Translation initiation factor 3	5478,83	*
HCAG_00267	Translation initiation factor eif3	646,04	*
HCAG_03569	Translation initiation factor eif3a	989,04	*
HCAG_05882	Tryptophanyl trna synthetase	1077,57	*
HCAG_06019	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 fusion protein	14005,84	1,768267039

6. ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS

HCAG_07682	26S protease regulatory subunit	366,3	*
HCAG_02901	26S protease regulatory subunit	376,4	*
HCAG_00039	26S protease regulatory subunit	784,94	1,599994191

HCAG_00069	26S protease regulatory subunit	1595,18	1,616074385
HCAG_04181	26S protease regulatory subunit	203,98	*
HCAG_02442	26S proteasome non atpase regulatory subunit	566,23	*
HCAG_00247	26S proteasome regulatory subunit	414,86	*
HCAG_09105	26S proteasome regulatory subunit	765,49	*
HCAG_01847	ADP ribosylation factor	10909,51	1,665291179
HCAG_01583	Aha1 domain family	5043,76	*
HCAG_00603	Aspartyl aminopeptidase	471,08	*
HCAG_00633	Calcineurin catalytic subunit cnaa	1043	*
HCAG_08345	Cell cycle control protein	15367,29	3,560852494
HCAG_04225	Clathrin heavy chain	1221,95	*
HCAG_06960	Cofilin	3278,33	2,159766213
HCAG_00176	Dnaj and TPR domain containing protein	381,38	*
HCAG_04095	DUF396 domain containing protein	403,55	*
HCAG_03748	FK506 binding protein 1A	811,45	*
HCAG_06262	GTP binding protein	736,14	*
HCAG_04686	Heat shock protein	46362,8	6,619368586
HCAG_04252	Metallopeptidase	402,94	*
HCAG_04853	Mitochondrial protein import protein MAS5	2012,72	*
HCAG_08291	Monothiol glutaredoxin-4	525,83	2,611696417
HCAG_00073	Nuclear localization protein	382,29	*
HCAG_07345	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	1724,36	2,013752683
HCAG_08833	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	24593,79	7,614086141
HCAG_06091	Polyubiquitin	18008,54	*
HCAG_01225	Proteasome 26S subunit	419,42	*
HCAG_06228	Proteasome 26S subunit	429,86	*

HCAG_04090	Proteasome component	380,31	*
HCAG_07121	Proteasome component	711,87	2,316366916
HCAG_08215	Proteasome subunit alpha	679,18	*
HCAG_06316	Proteasome-activating nucleotidase	367,73	*
HCAG_03630	Protein disulfide-isomerase precursor	9944,26	2,974274172
HCAG_04821	Protein phosphatases PP1 regulatory subunit sds22	466,1	*
HCAG_08377	Serine threonine phosphatase	837,72	*
HCAG_07282	T-complex protein	611,38	*
HCAG_03305	T-complex protein 1 subunit beta	933,57	*
HCAG_05524	T-complex protein 1 subunit eta	1141,7	*
HCAG_05525	T-complex protein 1 subunit eta	673,23	*
HCAG_04802	Thioredoxin domain containing protein	409,04	*
HCAG_01487	Ubiquitin conjugating enzyme	1927,76	*
HCAG_01770	Ubiquitin like modifier SUMO	1362,56	*
HCAG_07567	Zuotin	635,21	*

7. PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO / COFATOR

HCAG_01880	Actin binding protein	451,47	*
HCAG_02452	Cell division cycle protein	7188,92	1,632316236
HCAG_01328	Clathrin light chain	451,46	*
HCAG_02914	Glycine rich protein	12274,53	2,159766213
HCAG_01447	GTP binding protein	1405,55	2,386910865
HCAG_06941	GTP binding protein	2324,63	1,584073998
HCAG_07144	Myosin regulatory light chain cdc4	544,69	*
HCAG_06026	Polyadenylate binding protein	2456,3	1,632316236
HCAG_08950	Progesterone binding protein	2207,35	*

HCAG_07540	Ras like GTP binding protein RYL2	1904,32	*
HCAG_05306	RNP domain containing protein	2937,09	*
HCAG_04840	Small COPII coat gtpase sar1	2706,11	*
HCAG_05951	Vacuolar ATP synthase subunit B	640,7	*

8. REGULAÇÃO DO METABOLISMO E FUNÇÃO DE PROTEÍNAS

HCAG_04544	Peptide methionine sulfoxide reductase	1045,99	*
------------	--	---------	---

9. TRANSPORTE CELULAR

HCAG_07845	ABC transporter	350,43	*
HCAG_06610	Arp2/3 complex subunit	2577,83	1,521961536
HCAG_00048	Arsenical pump driving atpase	1158,54	*
HCAG_03176	DUF207 domain containing protein	400,74	*
HCAG_04824	Dynein light chain	2005,2	*
HCAG_05187	GTP binding nuclear protein GSP1 Ran	18463,48	2,509290432
HCAG_07659	GTP binding protein	260,09	*
HCAG_07669	Meiotically up regulated gene 87 protein	1,48	*
HCAG_03107	Membrane protein	583,16	*
HCAG_07102	Nuclear pore complex subunit	359,39	*
HCAG_00557	Phosphatidylinositol transfer protein SFH5	391,47	*
HCAG_06977	Plasma membrane atpase	404,61	*
HCAG_10603	Snare sec23	476	*
HCAG_05252	Snare sec24	465,46	*
HCAG_00404	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	2001,44	1,50681778

10. COMUNICAÇÃO CELULAR / TRANSDUÇÃO DE SINAL

HCAG_01835	CORD and CS domain containing protein	2542,39	*
HCAG_03194	Rab geranylgeranyl transferase escort protein	445,84	*
HCAG_06999	RAB1A	1369,98	1,934792385
HCAG_05787	Ser/Thr protein phosphatase	1007,09	2,293318702

11. RESGATE CELULAR E VIRULÊNCIA

HCAG_00272	Arsenite resistance protein Ars2	449,12	*
HCAG_07098	Cytochrome c peroxidase	2459,3	2,637944535
HCAG_08658	Cytochrome c peroxidase	468,25	*
HCAG_09319	Cytochrome c peroxidase	9386,29	2,117000017
HCAG_01785	Heat shock protein	496,42	*
HCAG_04943	Hsp10 like protein	23411,41	10,27794075
HCAG_06961	Hsp60 like protein	44302,76	4,953032542
HCAG_01398	Hsp70 like protein	60301,22	2,691234498
HCAG_05805	Heat shock 70 kda protein C precursor	7309,1	2,801065755
HCAG_00783	Hsp88 like protein	8480,9	2,363160728
HCAG_04111	Heat shock protein 30	3722,74	*
HCAG_08176	Heat shock protein SSC1	16061,23	3,287081395
HCAG_04471	Heat shock protein ST11	6316,99	3,18993317
HCAG_08451	Mitogen activated protein kinase	663,78	*
HCAG_03646	Stress protein p66	605,15	*
HCAG_06210	Thiol specific antioxidant	23966,17	1,915540783
HCAG_07019	Thioredoxin reductase	419,02	*

12. DIRECIONAMENTO CELULAR

HCAG_04115	Arp2/3 complex subunit	408,79	*
------------	------------------------	--------	---

13. BIOGÊNESE DE COMPONENTES CELULARES

HCAG_08210	Actin	10549,22	2,611696417
HCAG_03174	Arp2/3 complex 20 kda subunit	1477,2	1,786038401
HCAG_06375	Tropomyosin	6226,41	1,716006899
HCAG_01781	Tubulin beta chain	2290,45	2,1382762
HCAG_08288	Tubulin subunit alpha 2	4748,61	2,944679677

14. DIFERENCIAÇÃO DE TIPO CELULAR

HCAG_07461	Fimbrin	1092,39	1,954237353
HCAG_02846	Phosphoprotein phosphatase 2A regulatory subunit	415,23	*

15. NÃO CLASSIFICADAS

HCAG_04173	3 family protein	43525,16	2,075080647
HCAG_08796	Ankyrin repeat protein	1078,52	*
HCAG_07132	BAR domain containing protein	2751,71	1,616074385
HCAG_06110	Conserved hypothetical protein	9042,95	2,459603053
HCAG_07343	Conserved hypothetical protein	576,59	*
HCAG_07444	Conserved hypothetical protein	1044,1	*
HCAG_07970	Conserved hypothetical protein	840,68	*
HCAG_11116	Conserved hypothetical protein	733,6	*
HCAG_11677	Conserved hypothetical protein	396,04	*
HCAG_04232	Conserved hypothetical protein	794,29	*
HCAG_04347	Conserved hypothetical protein	519,33	*
HCAG_05552	Conserved hypothetical protein	2250,57	*
HCAG_07936	Conserved hypothetical protein	457,04	*

HCAG_09818	Conserved hypothetical protein	452,05	*
HCAG_00017	Conserved hypothetical protein	422,05	*
HCAG_00022	Conserved hypothetical protein	486,38	*
HCAG_00559	Conserved hypothetical protein	420,22	*
HCAG_01019	Conserved hypothetical protein	817,19	*
HCAG_01388	Conserved hypothetical protein	420,68	*
HCAG_01715	Conserved hypothetical protein	408,98	3,254374032
HCAG_02022	Conserved hypothetical protein	5522,88	*
HCAG_02522	Conserved hypothetical protein	61,71	*
HCAG_03731	Conserved hypothetical protein	491,51	*
HCAG_04741	Conserved hypothetical protein	490,11	*
HCAG_02296	DUF1014 domain containing protein	759,25	*
HCAG_06069	DUF1348 domain-containing protein	460,42	*
HCAG_02191	GCY protein	444,32	*
HCAG_00122	Hypothetical protein	1040,8	*
HCAG_10350	Hypothetical protein	518,1	2,054433269
HCAG_03758	Mitochondrial grpe	3353,5	2,585709628
HCAG_06409	PCI domain containing protein	798,52	*
HCAG_01399	Predicted protein	808,25	*
HCAG_03855	Predicted protein	612,51	*
HCAG_04505	Predicted protein	583,96	*
HCAG_09351	Predicted protein	432,51	*
HCAG_09929	Predicted protein	396,61	*
HCAG_09933	Predicted protein	497,14	*
HCAG_10315	Predicted protein	929,07	*
HCAG_10514	Predicted protein	368,29	*

HCAG_10780	Predicted protein	4735,13	9,1157167
HCAG_10781	Predicted protein	1761,95	*
HCAG_10924	Predicted protein	685,09	*
HCAG_11286	Predicted protein	547,18	*
HCAG_03851	RSC complex subunit	724,68	1,934792385
HCAG_04361	Vid27 family protein	516,05	*

^a Identificação de proteínas diferencialmente abundantes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, UK).

^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Relação levedura/micélio: Nível de abundância nas células de levedura dividido pelo nível em micélio.

^d Processo biológico das proteínas diferencialmente abundantes de acordo com os bancos de dados MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>) e Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

* Identificada apenas em levedura.

APÊNDICE D – TABELA SUPLEMENTAR 4

Tabela suplementar 4: Proteínas identificadas em *Histoplasma capsulatum* mais abundantes em micélio em relação a levedura

Número de acesso^a	Descrição da proteína^b	Score	Relação Micélio/Levedura^c
Categorias funcionais^d			
1. METABOLISMO			
Metabolismo de aminoácido			
HCAG_05761	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	660,06	1,682027618
HCAG_02751	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	382,66	*
HCAG_00678	3-methylcrotonyl-coa carboxylase biotin containing subunit	963,26	*
HCAG_08375	4-aminobutyrate aminotransferase	2906,55	*
HCAG_05363	5-oxoprolinase	1227,86	*
HCAG_06005	Acetolactate synthase	1251,86	3,525421454
HCAG_04183	Acetylornithine deacetylase	479,28	*
HCAG_10265	Adenosylhomocysteinase	12486,09	1,632316236
HCAG_04617	Aminotransferase	789,41	*
HCAG_05962	Hercynylcysteine S-oxide lyase	455,46	*
HCAG_06360	ATP phosphoribosyltransferase	1513,2	1,50681778
HCAG_03336	Branched chain alpha keto acid dehydrogenase E1 subunit beta	582	2,773194711
HCAG_03302	Branched chain amino acid aminotransferase	539,16	5,259310669
HCAG_01864	Copper amine oxidase	846,39	*
HCAG_04455	Cystathionine gamma synthase	383,65	*
HCAG_01780	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase prnc	1332,85	*
HCAG_09000	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase prnc	758,52	2,611696417
HCAG_07219	Dihydrodipicolinate synthetase family protein	809,25	*
HCAG_02120	Fumarylacetoacetase hydrolase family protein	794,17	4,572225108
HCAG_08662	Glutamate decarboxylase	785,29	*

HCAG_03455	Glycine cleavage system H protein	700,03	*
HCAG_05721	Homogentisate 1,2-dioxygenase	1418,7	*
HCAG_03301	Homoserine acetyltransferase	502,76	*
HCAG_02035	Imidazole glycerol phosphate synthase hisf	418,79	*
HCAG_04432	Indoleamine 2,3-dioxygenase family protein	2149,66	*
HCAG_00677	Isovaleryl-coa dehydrogenase	1677,65	*
HCAG_08086	Kynureninase	586,87	*
HCAG_01655	Kynurenine-oxoglutarate transaminase	673,6	*
HCAG_00676	Methylcrotonoyl-coa carboxylase beta chain	832,9	*
HCAG_06059	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	1835,48	4,48168907
HCAG_05540	N alpha acyl glutamine aminoacylase	663,15	*
HCAG_00397	NAD dependent epimerase dehydratase family protein	513,19	*
HCAG_07004	O-acetylhomoserine	458,61	1,896480852
HCAG_00575	O-methyltransferase	686,02	*
HCAG_08313	Oxidoreductase	742,68	*
HCAG_00889	Oxidoreductase	2497,77	3,421229602
HCAG_08156	Oxidoreductase	752,56	1,750672504
HCAG_06371	Phenylacetyl-coa ligase	391,44	1,750672504
HCAG_01145	Saccharopine dehydrogenase	1217,23	1,973877746
HCAG_01575	Saccharopine reductase	2729,37	1,616074385
HCAG_07261	Succinate semialdehyde dehydrogenase	1092,66	*
HCAG_00793	Threonine synthase	1392,28	*
HCAG_00067	Trimethyllysine dioxygenase	379,18	4,526730751
HCAG_04336	Tyrosinase	472,51	*
Metabolismo de nitrogênio, enxofre e selênio			
HCAG_04927	Acetamidase	531,52	*
HCAG_08831	Formamidase	20186,97	*
HCAG_07200	Nitrate reductase	1184	*

HCAG_07558	Nmra like family domain containing protein	1047,36	*
HCAG_00429	Oxidoreductase	1929,25	*
HCAG_08190	Oxidoreductase 2-nitropropane dioxygenase	1136,96	2,664456293
Metabolismo de nucleotídeos			
HCAG_08512	Adenosine kinase	980,35	2,316366916
HCAG_01433	Adenylosuccinate lyase	794,53	*
HCAG_06648	Allantoicase	569,75	*
HCAG_01893	Cytidine deaminase putative	514,25	*
HCAG_05757	Endonuclease exonuclease phosphatase family protein	1470,66	*
HCAG_01212	Sulfate adenylyltransferase	849,88	*
HCAG_03261	Thiamine biosynthesis protein	1801,89	*
HCAG_06443	Uracil phosphoribosyltransferase	678,1	*
Metabolismo de fosfato			
HCAG_00980	Alkaline phosphatase	1272,91	*
HCAG_05184	Stress protein DDR48	2015,61	*
Metabolismo de carboidratos			
HCAG_05094	2-methylcitrate dehydratase	9072,32	1,537257535
HCAG_05090	2-methylcitrate synthase	4778,23	2,585709628
HCAG_01606	Acetil-CoA ligase	508,35	7,028687916
HCAG_08670	Glucose methanol choline oxidoreductase	803,39	*
HCAG_00626	L xylulose reductase	7307,77	*
HCAG_01368	Lactoylglutathione lyase	2361,47	*
HCAG_08449	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase	382,89	*
HCAG_05089	Methylisocitrate lyase	392,94	2,013752683
HCAG_11124	NAD dependent formate dehydrogenase acia Fdh	8004,9	*
HCAG_09102	NADP D xylose dehydrogenase	919,71	*

HCAG_03605	NADP dependent mannitol dehydrogenase	27375,1	*
HCAG_02919	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	1870,55	6,049647176
HCAG_06234	PEP phosphonmutase	890,1	*
HCAG_07680	Ribitol kinase	440,79	*
HCAG_07206	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	405,9	2,181472203
HCAG_05311	Succinyl-coa 3-ketoacid coenzyme A transferase	997,27	*
HCAG_09614	UDP-glucose 4-epimerase	675,05	1,552707215
HCAG_04745	Y20 protein	39494,69	*

Metabolismo de lipídios e ácidos graxos

HCAG_01063	3-oxoacyl acyl-carrier-protein reductase	1329,7	*
HCAG_00814	Acetyl-coa acetyltransferase	2749,15	1,552707215
HCAG_08621	Acetyl-coa acetyltransferase	1229,88	1,568312167
HCAG_01711	Alpha beta hydrolase	466,82	*
HCAG_03184	Cytochrome P450 oxidoreductase	463,19	*
HCAG_02555	Dihydroxyacetone kinase	475,11	*
HCAG_11321	FAD dependent oxidoreductase	659,44	*
HCAG_02303	Fatty acid amide hydrolase	681,63	*
HCAG_08471	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	436,05	*
HCAG_03015	Phytanoyl-coa dioxygenase	846,06	*
HCAG_00118	Short chain dehydrogenase reductase	1093,78	*
HCAG_04443	Short chain dehydrogenase reductase	3040,14	*
HCAG_07776	Sphingolipid long chain base responsive protein PIL1	384,5	*

Metabolismo de vitaminas e co-fatores

HCAG_04089	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	463,56	*
HCAG_02662	Porphobilinogen deaminase	640,28	*
HCAG_05915	Thiazole biosynthetic enzyme	6809,64	*

Metabolismo secundário

HCAG_06504	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	2161,76	*
HCAG_07305	Isochorismatase domain-containing protein	1899,44	1,584073998
HCAG_04454	Molybdopterin synthase small subunit cnxg	683,45	*
HCAG_07761	Phenazine biosynthesis phzc phzf protein	319,59	*
HCAG_06128	Thij pfpi family protein	5487,97	*

2. ENERGIA**Glicólise e Gliconeogênese**

HCAG_05959	Alcohol dehydrogenase	566,41	*
HCAG_00576	Alcohol dehydrogenase	422,79	*
HCAG_01578	Alcohol dehydrogenase	1014,47	*
HCAG_02317	Alcohol dehydrogenase	1841,2	*
HCAG_05083	Alcohol dehydrogenase	573,72	*
HCAG_06397	Alcohol dehydrogenase	3336,29	*
HCAG_08367	Aldehyde dehydrogenase	5659,57	3,632786417
HCAG_06205	Aldehyde dehydrogenase	1321,11	*
HCAG_02371	Aldehyde dehydrogenase	9816,14	*
HCAG_08789	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	487,44	*
HCAG_08202	Glucose-6-phosphate isomerase	3345,96	1,584073998
HCAG_08447	Glycogen phosphorylase	443,75	*
HCAG_03661	Hexokinase	998,21	*
HCAG_07781	Pyruvate kinase	3453,42	1,616074385

Ciclo de glioxilato

HCAG_05266	Aconitase	4771,98	1,616074385
HCAG_10958	Isocitrate lyase	1771,38	2,857650982
HCAG_05084	Malate synthase	395,86	4,095955267

Via das pentoses-fosfato

HCAG_04329	Glucose 6 phosphate 1 dehydrogenase	657,31	*
HCAG_04762	6-phosphogluconolactonase	715,43	*
HCAG_05884	6-phosphogluconate dehydrogenase	8396,72	1,733253039

Ciclo do ácido tricarboxílico

HCAG_03323	Fumarate reductase flavoprotein subunit	3104,04	2,033991215
HCAG_04358	Isocitrate dehydrogenase	783,01	2,664456293

Respiração

HCAG_06929	NADH ubiquinone oxidoreductase	321,8	*
------------	--------------------------------	-------	---

 β -oxidação

HCAG_07725	3-hydroxybutyryl-coa dehydrogenase	850,56	2,181472203
HCAG_00780	Acetyl-CoA acyltransferase A	524,39	*
HCAG_08510	Acyl-coa dehydrogenase	2565,34	*
HCAG_09978	Acyl-coa dehydrogenase	1447,54	1,599994191
HCAG_02218	Enoyl-coa hydratase isomerase family protein	639,95	*
HCAG_00928	Short chain dehydrogenase	885,6	*

Conversão de energia

HCAG_02828	ATP synthase subunit 4	1245,09	*
------------	------------------------	---------	---

3. CICLO CELULAR E PROCESSAMENTO DE DNA**Ciclo celular**

HCAG_06189	Mitogen activated protein kinase	459,77	*
HCAG_02915	Zinc finger protein	323,55	*

4. TRANSCRIÇÃO

HCAG_08106	Nmra family transcriptional regulator	7405,14	*
HCAG_04114	RNA binding domain containing protein	444,19	*
HCAG_01318	Transcription factor rfef putative	5653,99	*
HCAG_06738	Trna cytosine-5-methyltransferase NCL1	577,73	*
HCAG_02738	U4 U6 X U5 tri snrnp complex subunit Prp4 family	467,68	*

5. SÍNTESE DE PROTEÍNAS

HCAG_05778	Eukaryotic peptide chain release factor GTP binding subunit	58,05	*
HCAG_06198	QDE2 protein	1100,39	*
HCAG_03055	Ribosomal protein L23a	3276,01	1,733253039
HCAG_05192	Ribosomal protein L31e	5516,34	1,50681778

6. ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS

HCAG_06935	Aminopeptidase	1055,9	2,293318702
HCAG_00037	Aspartic endopeptidase Pep2	3691,16	*
HCAG_04297	Aspartyl aminopeptidase	369,75	1,954237353
HCAG_04508	Carboxypeptidase	897,4	*
HCAG_08666	Carboxypeptidase	460,05	*
HCAG_01491	Dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	923,65	*
HCAG_08942	Dipeptidyl peptidase III	792,39	*
HCAG_04161	Geranylgeranyl transferase type I beta subunit	315,86	*
HCAG_03543	Glutamate carboxypeptidase	2045,48	3,7061735
HCAG_02754	Oligopeptidase family protein	618,16	1,973877746
HCAG_06342	Proteasome component	403,49	*
HCAG_04198	Proteasome component	884,35	*
HCAG_05739	Proteasome component	500,32	*
HCAG_05896	Pyroglutamyl peptidase type I	306,76	*
HCAG_00635	Serine proteinase	510,85	*
HCAG_03747	Serine threonine protein kinase cbk1	58,05	*

7. PROTEÍNAS COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO / COFATOR

HCAG_04426	AIF like mitochondrial oxidoreductase	1439,68	*
HCAG_06523	Curved DNA binding protein	1003,08	1,665291179
HCAG_03115	Rheb small monomeric gtpase rhba	734,07	*

8. TRANSPORTE CELULAR

HCAG_01041	GTP binding protein	512,8	*
HCAG_06463	K channel protein	790,43	*
HCAG_08974	Nonspecific lipid transfer protein	1143,19	*

9. RESGATE CELULAR E VIRULÊNCIA

HCAG_11461	Benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450	522,17	*
HCAG_08064	Catalase B	3577,16	1,840431425
HCAG_05109	Catalase isozyme A	540,66	*
HCAG_00642	Copper zinc superoxide dismutase	14672,71	*
HCAG_06177	Gamma glutamyltranspeptidase	482,4	*
HCAG_01006	Glutathione S transferase	1541,74	*
HCAG_02530	Hydroxyacylglutathione hydrolase	1245,04	*
HCAG_01543	Superoxide dismutase, mitochondrial precursor	465,38	*

10. DIFERENCIAÇÃO DE TIPO CELULAR

HCAG_01014	HET C domain containing protein HetC	17,88	*
------------	--------------------------------------	-------	---

11. NÃO CLASSIFICADAS

HCAG_02758	Conserved hypothetical protein	4447,83	*
HCAG_03253	Conserved hypothetical protein	425,99	*
HCAG_03288	Conserved hypothetical protein	675,05	*
HCAG_03343	Conserved hypothetical protein	1323,68	*

HCAG_04453	Conserved hypothetical protein	14119,72	*
HCAG_04771	Conserved hypothetical protein	438,69	*
HCAG_05185	Conserved hypothetical protein	3885,41	3,525421454
HCAG_05480	Conserved hypothetical protein	511,27	*
HCAG_05847	Conserved hypothetical protein	576,56	*
HCAG_06192	Conserved hypothetical protein	869,93	*
HCAG_06271	Conserved hypothetical protein	1589,68	*
HCAG_06488	Conserved hypothetical protein	42,82	*
HCAG_00447	Conserved hypothetical protein	499,49	1,858928051
HCAG_00629	Conserved hypothetical protein	1648,19	19,10595464
HCAG_00803	Conserved hypothetical protein	1142,25	3,254374032
HCAG_00947	Conserved hypothetical protein	672	*
HCAG_01170	Conserved hypothetical protein	634,1	*
HCAG_01717	Conserved hypothetical protein	485,08	*
HCAG_01952	Conserved hypothetical protein	695,19	*
HCAG_02623	Conserved hypothetical protein	328,74	*
HCAG_10123	Conserved hypothetical protein	825,45	*
HCAG_10241	Conserved hypothetical protein	543,01	*
HCAG_10554	Conserved hypothetical protein	42,3	*
HCAG_10975	Conserved hypothetical protein	542,38	*
HCAG_11214	Conserved hypothetical protein	1006,73	*
HCAG_11469	Conserved hypothetical protein	445,5	*
HCAG_08319	Dehydratase	620,43	*
HCAG_07572	DUF427 domain containing protein	1422,72	3,421229602
HCAG_01449	DUF636 domain containing protein	687,13	*
HCAG_08082	HHE domain containing protein	832,52	*
HCAG_08057	Hypothetical protein	1505,67	*
HCAG_10802	Hypothetical protein	379,72	*
HCAG_00223	Predicted protein	326,14	*

HCAG_01997	Predicted protein	409,34	*
HCAG_04526	Predicted protein	931,71	*
HCAG_05550	Predicted protein	598,91	*
HCAG_05686	Predicted protein	640,49	*
HCAG_08909	Predicted protein	3575,83	*
HCAG_09793	Predicted protein	389,58	*
HCAG_10773	Predicted protein	1025,34	*
HCAG_11145	Predicted protein	684,71	*
HCAG_11645	Predicted protein	551,92	*
HCAG_04397	Tdcf protein	21977,8	1,840431425

^a Identificação de proteínas diferencialmente abundantes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/histoplasma_capsulatum/MultiHome.html) utilizando o ProteinLynx Global Server vs. 2.4 (PLGS) (Waters Corporation, Manchester, UK).

^b Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^c Relação micélio/levedura: Nível de abundância em micélio dividido pelo nível nas células de levedura.

^d Processo biológico das proteínas diferencialmente abundantes de acordo com os bancos de dados MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>) e Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

* Identificada apenas em micélio.

APÊNDICE E – TABELA SUPLEMENTAR 5

Tabela suplementar 5: Proteínas antigênicas identificadas em extrato proteico da fase leveduriforme de *Histoplasma capsulatum*

Histoplasmoses^{a,b}	HET^c	HÍG^d	CON^e
30s ribosomal protein s10	X	X	-
30s ribosomal protein s7	X	X	-
37s ribosomal protein rsm24	X	X	-
37s ribosomal protein s5	X	-	-
37s ribosomal protein s9	X	X	-
3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	X	-	-
40s ribosomal protein s1	X	X	-
40s ribosomal protein s11	X	X	-
40s ribosomal protein s13	X	X	-
40s ribosomal protein s16	X	X	-
40s ribosomal protein s18	X	X	-
40s ribosomal protein s3	X	X	-
40s ribosomal protein s4	X	X	-
40s ribosomal protein s5	X	X	-
40s ribosomal protein s5a	X	X	-
40s ribosomal protein s7	X	X	-
40s ribosomal protein s8	X	X	-
40s ribosomal protein s9	X	X	-
50s ribosomal protein	X	-	-
60s ribosomal protein	X	X	-
60s ribosomal protein l10-b	X	X	-
60s ribosomal protein l11	X	X	-
60s ribosomal protein l13	X	X	-
60s ribosomal protein l17	X	X	-
60s ribosomal protein l18	X	X	-
60s ribosomal protein l18-b	X	X	-
60s ribosomal protein l2	X	X	-
60s ribosomal protein l20	X	X	-
60s ribosomal protein l23	X	X	-
60s ribosomal protein l24	X	X	-
60s ribosomal protein l27	X	X	-
60s ribosomal protein l3	X	-	-
60s ribosomal protein l31e	X	X	-
60s ribosomal protein l32	X	X	-
60s ribosomal protein l33	X	X	-
60s ribosomal protein l34	X	X	-
60s ribosomal protein l34b	X	X	-
60s ribosomal protein l35	X	X	-
60s ribosomal protein l36	X	X	-

60s ribosomal protein l37a	X	X	-
60s ribosomal protein l43	X	X	-
60s ribosomal protein l44	X	X	-
60s ribosomal protein l6	X	X	-
60s ribosomal protein l7	X	X	-
60s ribosomal protein l7a	X	X	-
60s ribosomal protein l9b	X	X	-
Aconitate hydratase	X	X	-
ADP, ATP carrier protein	X	X	-
Aldehyde dehydrogenase	X	X	-
Alternative oxidase	X	X	-
Alternative oxidase, mitochondrial	X	X	-
Amidase	X	X	-
Amp dependent synthetase and ligase	X	X	-
Arginase	X	X	-
ATP synthase subunit 4	X	-	-
ATP synthase subunit alpha	X	X	X
ATP synthase subunit beta	X	X	-
ATP synthase subunit d	X	X	-
ATP-dependent dna ligase	X	X	-
ATP-dependent dna ligase domain-containing protein	X	X	-
Catalase	-	-	-
Catalase B	-	-	-
Conserved hypothetical protein (hcbg_04622)	X	X	-
Conserved hypothetical protein (hcbg_04786)	X	X	-
Conserved hypothetical protein (hcbg_07081)	X	-	-
Conserved hypothetical protein (hcdg_00304)	X	X	-
Conserved hypothetical protein (hcdg_01216)	-	X	-
Conserved hypothetical protein (hcdg_05676)	X	X	-
Conserved hypothetical protein (hcdg_09454)	-	X	-
Conserved hypothetical protein (hceg_04807)	X	X	-
Conserved hypothetical protein (hceg_07721)	X	-	-
Cytochrome b-c1 complex subunit rieske, mitochondrial	X	-	-
Cytochrome c oxidase subunit 2	X	X	-
Cytosolic large ribosomal subunit protein l30	X	X	-
Dead_2 domain-containing protein	X	X	-

Dead_2 protein	X	X	-
Dead-box protein	X	X	-
Dihydrolipoamide s-succinyltransferase	X	X	-
Dihydrolipoamide succinyltransferase	X	X	-
Elongation factor 1 alpha	X	X	-
Glutaminase	X	X	-
Histone H2a	X	X	-
Histone H2b	X	X	-
Histone H4	X	X	-
Large subunit ribosomal protein l3	X	X	-
L-xylulose reductase	X	X	-
Lyr family protein	X	-	-
M antigen	-	-	-
Mitochondrial 37s ribosomal protein rsm27	X	X	-
Mitochondrial 54s ribosomal protein mrpl51	X	-	-
Mitochondrial 54s ribosomal protein yml20	X	X	-
Mitochondrial atp synthase subunit f	X	X	-
Mitochondrial f1f0 atp synthase subunit f	X	X	-
Mitochondrial flavo0 atp synthase subunit f atp17	X	X	-
Mitochondrial processing peptidase beta subunit	X	X	-
Mitochondrial processing peptidase subunit	X	X	-
Mitochondrial ribosomal protein dap3	X	X	-
Mitochondrial ribosomal protein subunit l51	X	-	-
Mrna splicing protein prp8	X	-	-
Nadh-ubiquinone oxidoreductase	X	-	-
Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	X	X	-
Outer mitochondrial membrane porin protein	X	X	-
Outer mitochondrial membrane protein porin	X	X	-
Plasma membrane atpase	X	X	-
Predicted protein (hcag_00858)	X	-	-
Processing/enhancing protein	X	X	-
Ribose-phosphate pyrophosphokinase	X	-	-
Ribosomal l10 protein	X	X	-
Ribosomal protein l14	X	X	-
Ribosomal protein l15	X	X	-
Ribosomal protein l22	X	X	-
Ribosomal protein l31e	X	X	-
Ribosomal protein l34 protein	X	X	-
Ribosomal protein l37	X	X	-
Ribosomal protein l37a	X	X	-
Ribosomal protein s13	X	X	-
Ribosomal protein s16	X	X	-

Ribosomal protein s2	X	X	-
Ribosomal protein s5	X	X	-
Ribosomal protein s9	X	X	-
Ribosomal protein srp1	X	X	-
Ribosomal protein yml20	X	-	-
Rnase iii domain-containing protein	X	-	-
Serine hydroxymethyltransferase	X	X	-
Small nuclear ribonucleoprotein	X	X	-
Small nuclear ribonucleoprotein sm d2	X	X	-
Small nuclear ribonucleoprotein sm d3	X	X	-
Sorbitol utilization protein sou1	X	X	-
Ssdna binding protein	X	X	-
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	X	-	-
U5 small nuclear ribonucleoprotein component	X	-	-
V-type proton atpase subunit a	X	-	-
Yeast phase specific protein	-	-	-
YPS-3 protein	-	-	-

^a Anotação dos genes no banco de dados do genoma de *Histoplasma* ou por homologia do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

^b Proteínas identificadas frente a soros de pacientes com histoplasmose nas três replicatas biológicas.

^c Proteínas identificadas frente a soros de pacientes com outras infecções fúngicas e tuberculose, em ao menos uma das três replicatas biológicas.

^d Proteínas identificadas frente a soros de indivíduos saudáveis, em ao menos uma das três replicatas biológicas.

^e Proteína identificada no experimento controle, em ao menos uma das três replicatas biológicas.